

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I  
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

---

Année 1971 - N° 65

**ASPECTS BIOCHIMIQUES  
DE L'ACTION DE L'ADRÉNALINE  
CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL D'ÉLEVAGE  
(*Salmo gairdnerii* Richardson)**

**THÈSE**

soutenue publiquement le 14 Décembre 1971

présentée

à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche  
des Sciences Pharmaceutiques

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Chantal PERRIER-Borel

née le 6 Janvier 1940

à VILLEURBANNE (Rhône)





UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I  
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1971 - 72

ASPECTS BIOCHIMIQUES  
DE L'ACTION DE L'ADRENALINE  
CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL D'ÉLEVAGE  
(Salmo gairdneri Richardson)



THÈSE

présentée  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

à l'Université Claude-Bernard  
Unité d'Enseignement et de Recherche  
des Sciences Pharmaceutiques  
par

Christian PERRIER-BONEL  
né le 6 février 1940  
à VILLEURBANNE (Rhône)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

L Y O N

Président : Monsieur le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M.R. TOURAINÉ, Maître de Conférences agrégé

2ème Vice-Président : M.P. PONCET, Maître Assistant

3ème Vice Président : M.D. SETTELEN, Etudiant

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

-----

UNITES

U.E.R. Médicale Grange-Blanche  
U.E.R. Médicale Alexis Carrel  
U.E.R. Médicale Lyon-Nord  
U.E.R. Médicale Lyon Sud Ouest  
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques  
U.E.R. des Techniques de Réadaptation  
U.E.R. de Biologie Humaine  
Institut Régional d'Education Physique  
et sportive  
U.E.R. de Mathématiques  
U.E.R. de Physique  
U.E.R. de Chimie et Biochimie  
U.E.R. des Sciences de la Nature  
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie  
U.E.R. de Physique nucléaire  
Institut Universitaire de Technologie I  
Institut Universitaire de Technologie II  
Observatoire

DIRECTEURS

M. le Professeur D. GERMAIN  
M. le Professeur C. GIROD  
M. le Professeur A. BERTOYE  
M. le Professeur L. TOLOT  
M.M. CARRAZ Maître de Conférences-Agrégé  
M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN  
M. J.C. CZYBA Maître de Conférences-Agrégé  
M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.  
  
M. le Doyen J. BRACONNIER  
M. le Professeur M. DUFAY  
Mle le Professeur D. GAUTHERON  
M. le Professeur L. DAVID  
M. le Professeur J. CHANEL  
M. le Professeur A. SARAZIN  
M. le Professeur L. FEUVRAIS  
M. J. GALLET  
M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546306\\_0016](https://archive.org/details/IA41546306_0016)

EXAMINATEURS DE LA THESE

. Président : Monsieur le Professeur J. GRAS

. Assesseurs : Monsieur le Professeur A. CIER

Monsieur le Professeur R. MALLEIN

Madame L. PEYRIN



A mes Parents

A mon Mari

A ma Fille

A ma Belle-Mère

A ma Famille

A tous ceux qui me sont chers



A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Jean GRAS  
Professeur de Biochimie Pharmaceutique

*Il nous a accueilli dans son laboratoire  
voici quatre ans et sa bienveillance à notre  
égard n'a jamais cessé depuis. Ses conseils  
judicieux et sa compétence technique nous  
ont été précieux au cours de ce travail  
dont il a guidé la réalisation.*

*En acceptant de présider notre jury de thèse,  
il nous donne une nouvelle preuve de  
son amitié.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'expression  
de notre vive reconnaissance et de notre  
entier dévouement.*



## A NOS JUGES

Monsieur le Professeur André CIER  
Professeur de Pharmacodynamie

Il nous honore en acceptant de juger ce travail. Nous lui sommes reconnaissant d'apporter la garantie de sa très haute compétence.

Monsieur le Professeur René MALLEIN  
Professeur de Biochimie Analytique

Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges. Notre collaboration aux activités d'enseignement nous a permis d'apprécier l'étendue de ses connaissances dans les domaines les plus variés. Il nous est agréable de pouvoir le remercier de l'accueil chaleureux et sympathique qu'il nous a toujours réservé.

Madame Lyliane PEYRIN  
Docteur ès Sciences  
Chargée de recherches au C.N.R.S.

Elle a bien voulu s'intéresser à notre travail et en a aidé la réalisation. Nous la remercions d'avoir accepté de nous juger et la prions de trouver ici le témoignage de notre reconnaissance.



A Madame Yvette GUDEFIN

A Madame Georgette THIBAUT

A Madame Christiane LAHET

A Monsieur Jean Marc PEQUIGNOT

En les remerciant de l'aide précieuse apportée à la réalisation de ce travail.

A tous les membres du Laboratoire Pharmaceutique de Biochimie

A Monsieur CROZET et au personnel de l'Etablissement de pisciculture de Saint-Savin.

Nous les remercions pour le matériel qu'ils nous ont fourni si aimablement.



A NOS MAITRES

*de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON.*



## I N T R O D U C T I O N

" Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver, et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Car il est écrit : celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer."

Saint-Augustin



Le travail que nous présentons entre dans le cadre d'une étude générale sur la Biochimie métabolique des Poissons entreprise depuis plusieurs années sous la direction du Professeur Jean GRAS. Il concerne certains aspects biochimiques de l'action de l'adrénaline chez la Truite Arc-en-Ciel d'élevage (*Salmo gairdneri* Richardson) et rejoint ainsi un autre domaine de recherches du Laboratoire Pharmaceutique de Biochimie, qui se rapporte aux modalités générales d'action de l'adrénaline.

Il pourrait, à priori, paraître étonnant qu'un tel animal d'expérimentation ait été choisi pour la réalisation d'une Thèse de Doctorat en Pharmacie. A cet égard, on doit tout d'abord souligner que les poissons sont de plus en plus utilisés comme matériel d'expérimentation, en particulier dans les domaines de la Pharmacologie et de la Toxicologie Pharmaceutique. Il faut également signaler que les poissons sont d'une manipulation facile et d'une maintenance aisée au Laboratoire. En outre, lorsqu'il s'agit de poissons d'élevage, les lots d'animaux provenant d'établissements de Pisciculture, présentent des garanties de standardisation au moins égales à celles offertes par les Mammifères.

En dehors de ces avantages non négligeables il faut signaler, sur le plan de la Physiologie et de la Biochimie, que les Poissons possèdent des systèmes régulateurs parfois plus simples, qui permettent de mieux cerner les mécanismes intimes du métabolisme. En contre partie, cependant, ils présentent l'inconvénient, bien connu des spécialistes, de subir l'influence de nombreux facteurs écologiques (58). L'orientation que nous avons donnée à ce travail permet de considérer comme secondaire le rôle joué par ces facteurs.

On doit enfin noter, bien que cet argument économique ne soit pas primordial, que le coût d'une expérimentation utilisant des poissons est peu élevé. A titre d'exemple, les expériences relatées dans la première partie de notre travail auraient été d'un prix de revient 30 fois supérieur si l'on avait choisi le lapin comme animal d'expérimentation.

Les résultats obtenus nous ont permis d'apporter des précisions sur la compréhension des effets métaboliques de l'adrénaline chez les Poissons et retiendront, nous l'espérons, l'attention des spécialistes. D'autre part, certains points de ce travail dépassent le cadre de la Biologie des Poissons. Une large expérimentation chez les Mammifères nous a paru indispensable et est, d'ores et déjà, entreprise. De nouvelles voies de recherche sont ouvertes qui pourraient avoir d'intéressantes applications.



Notre thèse comporte deux parties :

- . Dans une première partie nous présentons des résultats relatifs à l'action de l'adrénaline sur les espaces liquidiens du muscle squelettique.
- . La deuxième partie concerne certains effets métaboliques de l'adrénaline "in vivo".

Le plan que nous avons adopté est mentionné ci-après.



## P L A N

### PREMIERE PARTIE :

ACTION DE L'ADRENALINE SUR LES SECTEURS LIQUIDIENS DU MUSCLE LATERAL DE LA TRUITE - EFFETS DES SUBSTANCES ADRENOLYTIQUES.

Chapitre I - Généralités sur les méthodes de mesures de l'espace extra cellulaire des tissus.

- 1) - Diffusion des traceurs extra cellulaires.
- 2) - Cinétique de pénétration des traceurs ioniques.
- 3) - Mesure de surface sur des coupes histologiques.

Chapitre II - Matériel et techniques d'expérimentation.

- 1) - Produits.
- 2) - Animaux et prélèvements.
- 3) - Mesure de l'espace de diffusion de l'inuline.
- 4) - Etude cinétique de la diffusion du phosphate radioactif.
- 5) - Mesure de l'eau totale.
- 6) - Etude statistique des résultats.

Chapitre III - Résultats.

- 1) - Mesure de l'espace extra cellulaire par diffusion du phosphate radioactif.
- 2) - Etude de l'espace de diffusion de l'inuline.



- 3) - Mesure de l'eau totale.
- 4) - Effets des substances adrénolytiques.

#### Chapitre IV - Interprétation des résultats.

- 1) - Etude des espaces liquidiens du tissu musculaire " in vitro".
- 2) - Action de l'adrénaline sur les secteurs liquidiens du tissu musculaire.
- 3) - Effets des substances adrénolytiques sur l'augmentation de l'espace extra cellulaire induit par l'adrénaline.

### DEUXIEME PARTIE :

#### ETUDE DE CERTAINS EFFETS METABOLIQUES DE L'ADRENALINE CHEZ LA TRUITE "IN VIVO".

#### Chapitre I - Généralités sur les effets métaboliques des catécholamines.

- 1) - Les effets métaboliques des catécholamines chez les Mammifères.
- 2) - Les substances adrénolytiques et les effets métaboliques, essai de classification des recepteurs.
- 3) - Les effets métaboliques des catécholamines chez les Poissons.

#### Chapitre II - Matériel et techniques d'expérimentation.

- 1) - Produits.
- 2) - Animaux.
- 3) - Traitements.
- 4) - Prélèvements.



- 5) - Dosage de l'adrénaline plasmatique.
- 6) - Dosage du glucose plasmatique.
- 7) - Dosage des acides gras libres plasmatiques.
- 8) - Dosage du cholestérol plasmatique.
- 9) - Dosage des protéines plasmatiques.
- 10) - Dosage des acides aminés libres plasmatiques et tissulaires.
- 11) - Etude statistique des résultats.

### Chapitre III - Résultats.

- 1) - Evolution du taux de l'adrénaline plasmatique.
- 2) - Action de l'adrénaline sur la glycémie.
- 3) - Action de l'adrénaline sur le taux des acides gras libres plasmatiques.
- 4) - Action de l'adrénaline sur le taux du cholestérol plasmatique.
- 5) - Action de l'adrénaline sur le taux des protéines plasmatiques.
- 6) - Action de l'adrénaline sur le taux des acides aminés libres plasmatiques et tissulaires.

### Chapitre IV - Interprétation des résultats.

- 1) - Choix de la dose d'adrénaline administrée et évolution de l'adrénaline plasmatique.
- 2) - Action de l'adrénaline au niveau de métabolisme glucidique.
- 3) - Action de l'adrénaline au niveau du métabolisme lipidique.
- 4) - Action de l'adrénaline au niveau du métabolisme protidique.



P R E M I E R E P A R T I E

---

ACTION DE L'ADRENALINE SUR LES ESPACES  
LIQUIDIENS DU MUSCLE LATERAL DE LA TRUITE  
EFFETS DES SUBSTANCES ADRENOLYTIQUES



## C H A P I T R E I

### GENERALITES SUR LES METHODES DE MESURES DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE DES TISSUS

Pour déterminer la fraction liquidienne extra-cellulaire d'un tissu, on étudie essentiellement la diffusion de certaines substances.

Les méthodes utilisées peuvent être classées en deux groupes :

- Dans l'un on s'adresse à des substances qui diffusent uniformément dans le fluide extra-cellulaire sans pénétrer pour autant dans les cellules. On mesure le volume de distribution de ces traceurs en faisant le rapport des concentrations dans le tissu et dans le liquide baignant le tissu,
- L'autre groupe de méthodes utilise des substances qui pénètrent à l'intérieur des cellules, mais beaucoup plus lentement que dans le liquide interstitiel. La représentation graphique en fonction du temps, de la pénétration ou de la sortie du produit, donne une courbe à deux pentes qui permet de déterminer l'espace extra-cellulaire.

Enfin, on peut faire des mesures directes de la surface extra-cellulaire sur une image de coupe histologique. On peut en déduire la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire, en faisant intervenir une valeur arbitraire de la teneur en eau dans l'espace extra-cellulaire.

#### 1) - ETUDE DE LA DIFFUSION DES TRACEURS EXTRA-CELLULAIRE

##### Généralités

Les substances utilisées doivent être solubles, non toxiques, et non métabolisées par les tissus. Des produits très divers ont été employés. Les principaux sont : le thiocyanate de sodium ou d'ammonium, l'inuline, le saccharose, et la sérum albumine marquée à l'iode radio-actif (R.I.S.A.).

L'étude peut se faire "in vivo", la substance étant injectée à l'animal, en général par voie veineuse ; et "in vitro", le tissu étant placé dans



un milieu isotonique contenant le traceur.

### "In vivo"

Le traceur, à partie du sang, diffuse dans l'ensemble des liquides interstitiels de l'organisme. Le tissu à étudier est ensuite prélevé, et on détermine les concentrations respectives du traceur dans le tissu et dans le sérum. La perméabilité de la paroi capillaire pour les substances destinées à explorer l'espace liquidien extra-cellulaire implique qu'une fraction est perdue par élimination par voie urinaire. Le glomérule rénal est, en effet, un filtre dont les critères de perméabilité sont assez voisins de ceux des capillaires tissulaires. Pour que la concentration du traceur soit maintenue constante, condition d'un bon équilibre de répartition entre le liquide vasculaire et le liquide interstitiel, la fraction perdue par voie rénale doit être compensée, soit par néphrectomie, soit par une perfusion continue équilibrant la fuite urinaire. Ceci est surtout important pour les produits à diffusion lente tels que l'inuline.

On doit noter que l'espace de diffusion des traceurs extra-cellulaires peut être divisé en deux parties : le secteur vasculaire et le secteur interstitiel. Si l'on veut mesurer le seul secteur interstitiel, il faut déduire l'espace vasculaire, en faisant par exemple, un dosage d'hémoglobine dans le tissu.

### "In Vitro"

Le tissu est placé dans un liquide de survie contenant le traceur. Celui-ci diffuse dans l'espace liquidien extra-cellulaire, et s'y trouve à la même concentration que dans le liquide ambiant. Pour que la diffusion soit convenable, la coupe de tissu doit être assez mince ; si l'on étudie un organe, il faut réaliser des coupes de 1 à 2 mm d'épaisseur. L'étude, dans le temps de la concentration du traceur dans le tissu, en prélevant des fragments de tissu à des temps donnés permet d'obtenir une courbe en plateau. C'est à dire qu'après une période d'augmentation, la concentration devient maximum et reste inchangée par la suite. A ce moment là, la diffusion est complète. Le temps d'équilibration varie avec la substance utilisée.

La valeur de l'espace extra-cellulaire est calculée en faisant le rapport des concentrations dans le tissu et dans le liquide d'incubation ou le sérum. Les résultats s'expriment en millilitres pour 100 g de poids de tissu à l'état frais, en pourcentage par rapport au poids du tissu à l'état frais, ou encore en pourcentage par rapport à l'eau tissulaire totale déterminée par dessiccation. La difficulté dans ces méthodes réside dans le fait que l'on n'a jamais la certitude qu'une substance diffuse uniformément dans le fluide extra-cellulaire et ne pénètre pas à l'intérieur des cellules.



Ainsi pour un tissu donné, les chiffres obtenus varient avec le produit utilisé, et peut être est-il préférable au lieu de parler d'espace extra-cellulaire, de dire : espace de diffusion du thiocyanate ou de l'inuline.

BOZLER et LAVINE (14) opérant sur l'estomac de grenouille obtiennent un espace de 27,8 % avec l'inuline. Ce chiffre est supérieur dans la proportion de 34 % avec le saccharose. Le fructose donne une valeur supérieure de 8 % à celle donnée par le saccharose.

PAPPIUS et ELLIOT (71) étudiant divers tissus trouvent toujours un espace de diffusion du thiocyanate et du saccharose supérieur à celui de l'inuline. Et même, dans des coupes de foie et de cortex rénal, une diffusion complète du thiocyanate dans la totalité du tissu.

BARR et MALVIN (6) opérant sur le jéjunum de chien obtiennent, après 4 heures d'incubation, les résultats suivants (en pourcentage de l'eau totale) :

|                          |   |        |
|--------------------------|---|--------|
| - Arabinose              | : | 70,9 % |
| - Mannitol               | : | 69,2 % |
| - Saccharose             | : | 47,8 % |
| - Raffinose              | : | 49,4 % |
| - Inuline                | : | 43,6 % |
| - Sérum-Albumine marquée | : | 19,3 % |

On peut émettre l'hypothèse que le volume de distribution diminue quand la taille de la molécule augmente. Les petites molécules pénétreraient plus ou moins à l'intérieur des cellules, ce qui ne semble pas douteux dans l'exemple précédent pour l'arabinose et le mannitol. Mais on peut estimer également qu'une grosse molécule n'est pas forcément arrêtée mais diffuse plus difficilement dans les fins interstices existant entre les cellules, ce qui est peut être le cas de l'albumine marquée.

Il faut aussi considérer que la dissection, la préparation des coupes, et l'agitation, lorsque l'on opère "in vitro", peuvent léser les cellules. De plus, il se produit un gonflement variable suivant les tissus, probablement d'origine extra-cellulaire. Pour toutes ces raisons, PAPPIUS et ELLIOT (71) préfèrent déterminer l'espace non-inuline qui est la différence entre l'eau totale et l'eau équilibrée avec l'inuline. Ils considèrent cette méthode comme satisfaisante pour la mesure de l'espace intra-cellulaire intact. L'espace de diffusion de l'inuline correspond à l'espace extra-cellulaire et à l'espace "endommagé".



Un point qui semble très important quant aux erreurs possibles est le mode de sèchage du tissu avant de le peser. Il faut qu'il soit débarrassé totalement du liquide d'incubation superficiel.

Nous allons maintenant envisager les principes d'utilisation des principaux traceurs.

#### 1) - Méthode à l'inuline

L'inuline est un polyside d'origine végétale constitué d'une trentaine d'unités de fructose dont le poids moléculaire est d'environ 5000.

L'étude de la diffusion de cette substance a été pratiquée par de nombreux auteurs sur des tissus très divers.

##### "In vivo"

L'inuline est rapidement éliminée dans les urines ; il faut donc procéder soit à la néphrectomie bilatérale ou à la ligature des pédicules rénaux (35), soit à une perfusion continue adaptée à la fuite rénale (20).

##### "In vitro"

Le tissu ou la coupe de tissu est placé dans une solution tampon isotonique et oxygénée, contenant de 0,2 à 1 % d'inuline. La diffusion uniforme de l'inuline dans l'espace extra-cellulaire se fait plus ou moins rapidement selon la nature du tissu étudié. Le temps d'incubation est en général de 1 à 2 heures à 37°.

Pour le dosage de l'inuline, les tissus doivent subir une préparation préalable : soit un broyage dans l'acide trichloracétique suivi d'une centrifugation et prélèvement du liquide surnageant, soit une diffusion dans l'eau distillée avec agitation pendant plusieurs heures, enfin le tissu peut être solubilisé par chauffage dans une solution alcaline.

De très nombreuses méthodes de dosage de l'inuline ont été proposées ; elles reposent toutes sur le même principe : par chauffage en milieu acide concentré, l'inuline, sous forme de fructose, est deshydratée en hydroxyméthyl furfural qui conduit à des produits de condensation fortement colorés, avec des amines ou des phénols : diphénylamine (3) ; anthrone (50) ; résorcine (46, 48, 85, 86, 90) ; acide thiobarbiturique (73, 102). D'autre part, on peut faire des mesures de radioactivité en utilisant l'inuline marquée au Carbone 14 ou au tritium (6, 12, 22, 42).



## 2)- Méthode au saccharose

On utilise le saccharose "in vivo" après néphrectomie ou en maintenant une perfusion continue (20).

"In vitro", il est employé en solution isotonique que l'on ajoute au milieu d'incubation. D'assez larges variations de la concentration finale n'ont pas d'effets sur les résultats obtenus (14).

Le dosage peut porter sur le glucose après interversion. Généralement, on dose le fructose et les méthodes sont les mêmes que pour l'inuline. On peut également utiliser le saccharose sous forme radioactive (6, 12, 42).

De nombreuses substances glucidiques ont également été utilisées, en particulier, sous forme radioactive, marquées au carbone 14 :

- Fructose (14)
- Xylose (42)
- Arabinose (6, 22)
- Erythritol (22)
- Mannitol (6, 22)
- Raffinose (6)

Le principe de leur utilisation est le même que précédemment.

## 3)- Méthode à la sérum-albumine marquée à l'iode radioactif

Cette méthode (6, 22) a été appliquée aux études "in vitro". La diffusion est très longue, de l'ordre de 4 heures. C'est le traceur qui donne les valeurs les plus faibles. Etant donné la taille de la molécule on peut être certain qu'elle ne pénètre pas dans les cellules, mais on ne peut pas affirmer que la diffusion dans l'espace extra-cellulaire soit totale.

## 4)- Méthode au thiocyanate

Le thiocyanate, bien que très utilisé pour la mesure du secteur extra-cellulaire d'organismes entiers, a été assez peu employé pour les mesures sur les organes isolés. On l'utilise sous forme de sels d'ammonium ou de sodium.



### "In vivo"

On injecte 20 mg pour 100 g de poids par voie intraveineuse. La néphrectomie n'est pas nécessaire car le thiocyanate diffuse très rapidement, et on peut sacrifier l'animal au bout de 6 à 10 minutes. (60).

### "In vitro"

Le thiocyanate est employé à une concentration finale de 0,15 % dans le milieu d'incubation. (71).

Le dosage met à profit la formation d'un complexe coloré avec le nitrate ferrique en solution dans l'acide nitrique (13).

On peut également utiliser le thiocyanate radioactif (12).

On doit signaler enfin que l'on a mesuré comme valeur de l'espace extra-cellulaire, l'espace de diffusion de certains ions (brome, sodium, chlore) sous forme naturelle ou d'isotopes radioactifs, en prenant pour hypothèse la répartition exclusivement extra-cellulaire de ces ions. Malheureusement, cette hypothèse est inexacte, en particulier dans le cas du muscle lisse. Les valeurs obtenues, très élevées, correspondent de toute évidence, à une pénétration intra-cellulaire (98).

DANIEL et ROBINSON (21) ont utilisé le dosage du chlore, mais en employant des facteurs de correction. Il déterminent le chlore lié, non ionisé, en plaçant le tissu dans un liquide dépourvu de chlore, et en dosant le chlore résiduel dans le tissu. La concentration intra-cellulaire du chlore est considérée comme étant dans le rapport de 1/6,5 par rapport à la concentration extra-cellulaire connue (avec l'hypothèse d'un potentiel de Dönnan de 50 mV).

Cependant les ions sont fréquemment utilisés pour mesurer l'espace extra-cellulaire d'un tissu, mais selon des modalités différentes, que nous allons maintenant envisager.

## II - ETUDE CINETIQUE DE LA PENETRATION DE TRACEURS IONIQUES

Dans ces méthodes, il s'agit non pas de déterminer le volume de distribution d'une substance, mais d'étudier sa vitesse de pénétration. Les traceurs sont des ions qui pénètrent dans les cellules à une vitesse différente de celle à laquelle ils passent dans l'espace extra-cellulaire.

On s'adresse, soit à des ions étrangers au tissu (lithium) qui peuvent être utilisés sous forme naturelle, soit à des isotopes radioactifs ( $^{24}\text{Na}$ ,  $^{38}\text{Cl}$ ,  $^{32}\text{P}$ ).



Le tissu est placé dans un milieu d'incubation contenant le traceur. On détermine la concentration du traceur dans le tissu en pourcentage par rapport au liquide d'incubation, en fonction du temps. On obtient une courbe à deux pentes (voir figure 2, page 27).

La pente rapide correspond à la pénétration dans le fluide extra-cellulaire et la pente lente à l'entrée dans les cellules. Si l'on admet que le traceur se trouve à la même concentration dans le liquide extra-cellulaire et dans le milieu d'incubation, en extrapolant la deuxième partie de la courbe au temps zéro, on obtient la valeur de l'espace extra-cellulaire. L'aspect de la courbe peut légèrement varier suivant les ions, certains pénètrent plus rapidement que d'autres, mais on observe toujours deux parties distinctes.

WOLFIN, CLAUSER et EBOUE (100) ont déterminé l'espace extra-cellulaire de l'utérus de rate à l'aide de phosphate radioactif ( $^{32}\text{P}$ ). Ils déterminent la radio activité sur l'extrait trichloracétique de l'organe, après minéralisation. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radio activité du milieu d'incubation traité par l'acide trichloracétique et sans minéralisation. L'équilibre entre l'espace extra-cellulaire et le milieu d'incubation est réalisé en moins de deux minutes. Ils obtiennent une valeur voisine de celle donnée par la diffusion du thiocyanate.

GOODFORD et HERMANSEN (39) ont étudié l'espace extra-cellulaire de bandettes musculaires (*taenia coli*) de l'intestin de cobaye. La valeur est de 40 % avec le lithium, et de 70 % avec le Sodium 24, ce qui est probablement une valeur erronée, cet ion pénétrant extrêmement vite.

On peut faire l'étude inverse, c'est à dire étudier la vitesse de sortie d'un ion présent naturellement dans le tissu, celui ci étant placé dans un liquide ne contenant pas l'ion à étudier. On mesure l'apparition de l'ion dans le liquide d'incubation.

BITMAN et coll.(10) ont mesuré l'espace extra-cellulaire de l'utérus de lapine en étudiant la vitesse de sortie du sodium. Le tissu est immergé dans une solution oxygénée de glucose à 5 %. Des portions aliquotes sont prélevées à des intervalles de temps réguliers et remplacées par un volume égal de solution de glucose. Le taux du sodium est déterminé par photométrie de flamme. La courbe d'élimination montre deux pentes : une pente rapide de diffusion à partir de l'espace extra-cellulaire, et une pente lente correspondant à la sortie du sodium présent dans les cellules. On extrapole la deuxième pente au temps zéro, ce qui donne la quantité de sodium extra-cellulaire présente dans le tissu. L'eau extra-cellulaire est mesurée en faisant le rapport avec la concentration du sodium extra-cellulaire ; cette dernière étant égale à la concentration dans le sérum multipliée par 0,95 (facteur de correction de Donnan).



### III - MESURE DE SURFACE SUR DES COUPES HISTOLOGIQUES

PROSSER et Coll.(80) ont étudié l'espace extra-cellulaire de divers tissus à partir de coupes histologiques. Le cliché obtenu au microscope électronique avec un grossissement de 10.000 fois est tiré sur papier et agrandi 4 fois. Les auteurs mesurent la surface extra-cellulaire au moyen d'une grille de 1 mm<sup>2</sup>.

GOODFORD et HERMANSEN (39) ont également fait des mesures planimétriques pour déterminer l'espace extra-cellulaire du taenia coli du cobaye.

Un des inconvénients de cette méthode réside dans les modifications apportées par les techniques de fixation et de coupe, et qu'il est impossible d'évaluer.

Un autre inconvénient est que l'on mesure l'espace extra-cellulaire total, et que pour déterminer l'espace liquidien extra-cellulaire, il faudrait connaître la teneur en eau du milieu extra-cellulaire. VILLAMIL et Coll.(99) en prenant une teneur en eau de 70 % pour la carotide du chien, obtiennent une valeur voisine de celle des espaces de diffusion de l'inuline et du saccharose.



## C H A P I T R E   I I

### MATERIEL ET TECHNIQUES D'EXPERIMENTATION

#### 1) - PRODUITS

- . L.Adrenaline base (N B C). Solution stock  $10^{-2}$ M dans l'acide chlorhydrique 0,02 N.
- . Inuline alcali stable préparée selon la technique de WEIL (101) à partir d'inuline purifiée (Prolabo).

Une solution d'inuline à 10 % est portée au Bain Marie bouillant pendant 30 minutes en présence de soude à raison de 5 ml de soude concentrée pour 100 ml de solution d'inuline. On neutralise par de l'acide chlorhydrique concentré. On purifie ensuite par précipitation à l'éthanol à 95° (5/1 V.: V). Après centrifugation le surnageant est rejeté et le précipité est redissout en ajoutant 75 % du volume d'origine d'eau distillée, et en portant au Bain Marie bouillant. La précipitation éthanolique est répétée 10 fois. On obtient après passage à l'étuve une poudre blanche qui dans l'eau, donne une solution pratiquement incolore dont on prépare une solution mère à 20 % que l'on conserve au réfrigérateur.

- . Phosphore radioactif sous forme d'une solution de  $\text{Na H}_2^{32}\text{PO}_4$  d'une activité de 2 millicuries par millilitre (C E A).

Cette solution est hydrolysée par HCL N au Bain Marie bouillant pendant 10 minutes, et neutralisée par une solution normale  $\text{NaHCO}_3$ .

- . Phentolamine : ("Régitine" CIBA) sous forme d'ampoules dosées à 10 mg/ml.
- . Propranolol : ("Avlocardyl" AVLON) sous forme d'ampoules dosées à 5 mg/5 ml.

#### 2) - ANIMAUX ET PRELEVEMENTS

Nous avons utilisé des truites arc-en-ciel d'élevage (Salmo gairdnerii Richardson) pesant de 150 à 250 grammes et provenant de l'Etablissement de pisciculture de Saint-Savin dans l'Isère.



Pour transporter les animaux nous avons utilisé des récipients en matière plastique contenant environ 20 litres d'eau sous courant d'oxygène (débit voisin de 0,3 litre/minute) pendant tout le transport.

Au laboratoire, les animaux ont été placés dans un bac en matière plastique alimenté en eau courante (température  $12^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ). De manière à uniformiser nos conditions expérimentales, nous n'avons utilisé les animaux que 4 jours après leur arrivée au Laboratoire, et chaque lot d'animaux a été utilisé dans un délai de 10 jours suivant l'arrivée. Pendant cette période, les truites n'ont pas reçu de nourriture.

Les truites ont été sacrifiées par section de la moelle cervicale. Le muscle dorsal (partie épaxiale du muscle latéral du tronc) a été rapidement prélevé. Des coupes ont été obtenues par section transversale et immédiatement placées dans le milieu d'incubation.

### 3) - MESURE DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE PAR ETUDE DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE

#### 1) Incubation

Nous avons utilisé comme milieu d'incubation le liquide tampon phosphate type II de KREBS (51) contenant 0,9 gramme/litre de glucose.

Nous avons réalisé des coupes de muscle pesant de 0,7 g à 1 g et d'environ 2 mm d'épaisseur. Chaque expérience a été effectuée sur 4 coupes de tissu provenant d'un même animal. Elles sont placées dans un erlenmeyer de 100ml en présence de 40 ml de tampon contenant 0,25 % d'inuline purifiée alcali stable.

Le Bain Marie thermostaté ( $25^{\circ}$ ) et le système d'agitation sont ceux d'un appareil de Warburg. Un dispositif spécial s'appuyant sur les porte-manomètres maintient les erlenmeyers dans le Bain Marie.

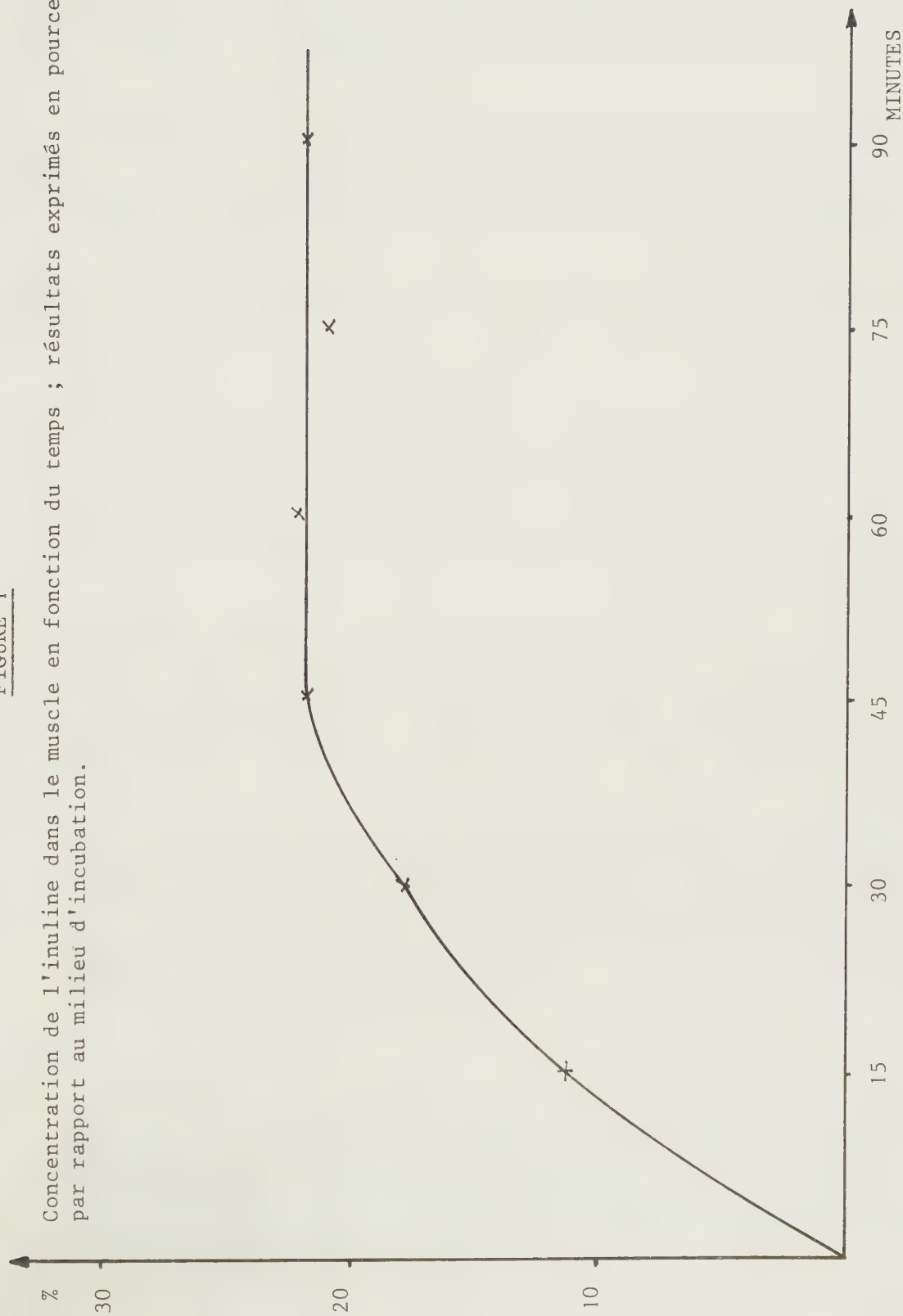
La saturation en oxygène est maintenue par un faible courant gazeux passant dans les erlenmeyers qui sont munis de bouchons à double tubulure.

Le temps d'incubation est de 70 minutes. Il a été choisi après une étude cinétique de la diffusion de l'inuline dont les résultats sont indiqués sur la figure 1.



FIGURE 1

Concentration de l'inuline dans le muscle en fonction du temps ; résultats exprimés en pourcentage par rapport au milieu d'incubation.





Après 40 minutes, les coupes sont placées dans un deuxième bain de même composition, afin d'éliminer les débris tissulaires. A la fin de l'incubation, le muscle est soigneusement essoré entre deux feuilles de papier filtre, puis il est pesé.

Les incubations en présence d'adrénaline ont été réalisées de la même manière ; l'adrénaline est ajoutée au milieu sous un volume de 0,1 ml au bout de 60 minutes (temps de contact 10 minutes), ou de 40 minutes (temps de contact 30 minutes) ; les concentrations dans le milieu d'incubation allant de  $10^{-7}$  M à  $10^{-5}$  M (18,3 à 1830 microgrammes par litre).

Lorsque l'on opère en présence de substances adrénolytiques, celles-ci sont ajoutées au milieu dès le début de l'incubation, aux concentrations suivantes

- |                |            |
|----------------|------------|
| - Propranolol  | 4 mg/litre |
| - Phentolamine | 4 mg/litre |
| (Propranolol   | 2 mg/litre |
| - Mélange(     |            |
| (Phentolamine  | 2 mg/litre |

## 2) Dosage de l'inuline

Pour le dosage de l'inuline, nous avons utilisé la méthode de ROSS et MOKOTOFF (86) en y apportant quelques simplifications. Cette méthode nécessite la préparation d'inuline alcali stable, mais elle a l'avantage de détruire le glucose et d'autres substances chromogènes pouvant intervenir dans la réaction.

La coupe de muscle est placée dans un tube gradué à 20 ml, bouchant à l'émeri, avec 2,4 ml de soude 0,85 N. Le tube est placé au Bain Marie bouillant jusqu'à solubilisation complète du tissu, c'est à dire environ 10 minutes, en agitant à des temps réguliers. On neutralise par 0,8 ml d'HCl 2,5 N. Les protéines sont ensuite précipitées par le mélange de SOMOGYI.

- 4 ml de  $Zn SO_4$  , 7 H<sub>2</sub>O à 10 % et

- 4 ml de Na OH 0,5N.

On complète à 20 ml avec de l'eau distillée. On agite vigoureusement, on laisse reposer, et on filtre. On transfère 1,5 ml en double exemplaire dans des tubes bouchant à l'émeri. On ajoute 0,5 ml de réactif de la résorcine (0,1 gramme de résorcine, 0,25 gramme de thiourée dans 100 ml d'acide acétique glacial), et 3 ml d'HCl concentré (densité 1,19).



Les tubes sont placés au Bain Marie à  $80^{\circ} \pm 1^{\circ}$  pendant 10 minutes à l'obscurité. Les tubes sont ensuite refroidis sous l'eau et maintenus à l'abri de la lumière. On détermine la densité optique à 520 nanomètres. (Spectrophotomètre DB Beckmann).

Le liquide d'incubation est traité de la même façon en utilisant 0,3 ml prélevé avec une pipette de précision.

Plusieurs essais nous ayant montré que la valeur d'un "blanc muscle" n'était pas différente de celle du "blanc réactif", nous avons supprimé cette phase du dosage.

### 3) Calcul de l'espace de diffusion

L'espace de diffusion est calculé en faisant le rapport :

Concentration dans le muscle exprimée en densité optique

---

Concentration dans le liquide exprimée en densité optique

Il s'exprime en millilitres pour 100 grammes de poids de tissu à l'état frais.

### 4) - MESURE DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE PAR ETUDE CINETIQUE DE LA DIFFUSION DU PHOSPHATE RADIOACTIF

Nous avons utilisé la technique de WOLFIN et coll. (100).

#### 1) Incubation

Les coupes de tissu pesant environ 0,5 gramme et d'une épaisseur moyenne de 1 mm, sont incubées séparément dans 10 ml de milieu tampon phosphate de KREBS (51) contenant 20 microcuries de phosphore radioactif,  $^{32}\text{P}$ , et préalablement thermostaté pendant 5 minutes.

L'incubation se fait à  $25^{\circ}$  sous atmosphère d'oxygène et agitation constante en utilisant le même appareillage, que pour les études avec l'inuline.

Dans les expériences en présence d'adrénaline, ce composé au milieu avant le début de l'incubation. La concentration d'adrénaline utilisée est de  $10^{-7}$  M.

Les coupes de tissu sont prélevées après 2, 5, 10, 15, et 20 minutes. Après chaque prélèvement la coupe est rapidement essorée



entre deux feuilles de papier filtre et pesée.

## 2) Mesure du phosphore radioactif

Le tissu est immédiatement broyé dans un homogénéiseur BIOREX refroidi à 0°, en présence d'acide trichloracétique à 10 %, à raison de 10 ml d'acide trichloracétique par gramme de tissu. Les homogénats sont centrifugés pendant 20 minutes à 40.000 x g et à + 4° (centrifugeuse réfrigérée M S E HS 18). Le milieu d'incubation (1ml) est également traité par l'acide trichloracétique (10 ml) et centrifugé.

Les échantillons radioactifs (sous un volume de 0,5 ml) sont placés dans des flacons de comptage normalisés en verre et mis à évaporer à l'étuve à 80° pendant 2 heures. On introduit ensuite après refroidissement dans chaque flacon 5 ml du mélange scintillateur suivant :

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| 2.5 diphényl oxazole                   | 5 grammes  |
| 1.4 bis [2.(5 phényl oxazoly)] benzène | 0,3 gramme |
| Toluène MERCK pour analyse qsp         | 1000 ml.   |

Les flacons sont mis à refroidir à + 4° dans le compteur quelques heures avant les mesures.

Les comptages sont effectués dans un compteur à scintillation liquide (Nuclear Chicago, modèle 725) comportant deux photomultiplicateurs.

Chaque photomultiplicateur (PM) à sa propre haute tension caractéristique : il convient de fixer une haute tension minimale, correspondant à l'un des PM, appelée "DATA" et une haute tension maximale correspondant à l'autre PM, appelée "GATE".

En pratique, le point de balance du phosphore (c'est à dire l'ensemble des réglages permettant de mesurer une activité optimale) a été déterminé par des essais préliminaires. Les conditions de comptage ont été les suivantes :

|        |   |            |
|--------|---|------------|
| "DATA" | = | 775 volts  |
| "GATE" | = | 1300 volts |
| Gain   | = | 1 : 1      |

Il a été évidemment tenu compte dans l'expression des résultats :

- Du mouvement propre de l'appareil (très peu différent de 40 coups/minutes)



- Du temps de comptage (calculé de manière à obtenir toujours une valeur supérieure à 10.000 coups)
- De la décroissance radioactive propre au  $^{32}\text{P}$  (Période : 14, 26 jours).

### 3) Calcul de l'espace extra-cellulaire

L'étude cinétique de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le phosphate total des coupes de tissu, montre qu'en deux minutes l'équilibre isotopique entre l'espace extracellulaire et le milieu d'incubation est atteint (voir figure 2, page 27).

La représentation graphique du pourcentage de la radioactivité dans le tissu par rapport au liquide d'incubation, en fonction du temps d'incubation, est une droite de faible déclivité.

Si on considère que le traceur est à la même concentration dans l'espace extra-cellulaire et dans le milieu d'incubation, il est possible d'extrapoler cette droite au temps zéro. La valeur obtenue sur l'axe des ordonnées représente le pourcentage de radioactivité du phosphate extra-cellulaire et par conséquent la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire que l'on peut exprimer en ml pour 100 grammes de poids de tissu à l'état frais.

### 5) MESURE DE L'EAU TOTALE

Le milieu et les conditions d'incubation sont exactement les mêmes que celles décrites pour la mesure de l'espace de diffusion de l'insuline.

Après l'incubation, les coupes sont essorées, placées sur un verre de montre taré et pesées. Elles sont ensuite mises à l'étuve à  $110^{\circ}$  pendant 4 heures et pesées de nouveau, après refroidissement.

La valeur de l'eau totale est calculée en faisant le rapport :

$$\frac{\text{Poids frais} - \text{Poids sec}}{\text{Poids frais}}$$

Elle est exprimée en millilitres pour 100 grammes de poids de tissu à l'état frais.



## 6) ETUDE STATISTIQUE DES RESULTATS

Dans l'étude d'un phénomène biologique les résultats de nombreuses mesures se groupent autour d'une valeur moyenne. Les différences sont dues à la précision des techniques mais aussi aux variations individuelles entre les animaux utilisés. Il est nécessaire de savoir avec quelle précision est obtenue la valeur moyenne et dans quelles limites sont comprises les valeurs mesurées.

Lorsque l'on compare deux séries de mesures dont les valeurs moyennes diffèrent, il convient de déterminer si cette différence n'est pas due simplement au hasard. Il faut pour cela procéder à l'analyse statistique des résultats. Les formules statistiques utilisées au cours de ce travail sont rappelées ci-dessous.

### . Moyenne arithmétique

Les moyennes indiquées dans nos tableaux sont des moyennes arithmétiques ( $\bar{x}$ ). Elles sont obtenues en divisant la somme des valeurs individuelles par le nombre des observations.

### . Déviati on standard de la moyenne ou erreur type

L'erreur standard sur la moyenne indique avec quelle précision la moyenne a été déterminée, elle est définie par la formule

$$sm = \sqrt{\frac{\sum (x - M)^2}{N (N - 1)}}$$

où

- .  $x$  = une valeur individuelle
- .  $M$  = la moyenne arithmétique des valeurs
- .  $N$  = le nombre des observations.

### . Analyse de variance : Test F

L'analyse de variance consiste essentiellement à décomposer la variance totale d'un ensemble en variances partielles, correspondant à des sources de variation différentes et déterminées. Ces variances sont ensuite comparées entre elles au moyen d'un test appelé test F. La variance, qui est une mesure de la dispersion, s'obtient en divisant la somme des carrés par le nombre de degrés de liberté.

Le test F, dont le principe détaillé est décrit par LISON (57), permet de comparer deux séries de mesures. Cette comparaison se fait en testant l'hypothèse nulle, c'est à dire l'hypothèse que les deux séries ont été tirées d'une population unique. Si l'hypothèse est



contredite par le test, on conclut que les deux séries sont différentes.

Pour les deux séries de mesures A et B, la conduite des calculs est la suivante :

a) les calculs préliminaires

On doit avoir

- 1° La somme des données pour chaque série (SXA, SXB) et le total général pour les deux données

$$SX = SXA + SXB$$

- 2° La somme des carrés des données,  $SX^2A$ ,  $SX^2B$  et leur total général

$$(SX)^2 = SX^2A + SX^2B$$

- 3° Le "terme de correction" C, obtenu en divisant le carré de la somme totale des données  $(SX)^2$  par le nombre total de données ( $n = nA + nB$ )

$$C = \frac{(SX)^2}{n}$$

b) Variation totale  $Sx^2 \Gamma$

La somme des carrés pour la variation totale est obtenue en prenant la somme totale des carrés des données  $(SX)^2$  et en soustrayant le terme de correction C.

$$Sx^2 \Gamma = (SX)^2 - C$$

Le nombre de degrés de liberté, DL, correspondant est égal au nombre total de données moins un.

$$DL = (nA + nB) - 1$$

c) Variations entre groupes  $Sx^2 E$

La somme des carrés s'obtient de la manière suivante : On élève au carré la somme des données relatives au premier groupe A, et on divise par le nombre de données contenues dans ce groupe. On procède de



même pour l'autre groupe B, on fait la somme de ces valeurs, et on soustrait le terme de correction.

$$\text{somme des carrés} = Sx^2 E = \frac{(SXA)^2}{nA} + \frac{(SXB)^2}{nB} - C$$

Le nombre de degrés de liberté, DL, est égal au nombre de groupes moins un.

d) Variation à l'intérieur des groupes  $Sx^2 I$

La somme des carrés s'obtient en prenant la somme totale du carré des données  $(SX)^2$  et en soustrayant le premier terme du calcul fait pour la variation entre groupe. Le nombre de degrés de liberté est égal à la somme du nombre des données de chaque groupe, diminué chaque fois de un.

$$DL = (nA - 1) + (nB - 1)$$

$$\text{Somme des carrés } Sx^2 I = (SX)^2 - \left[ \frac{(SXA)^2}{nA} + \frac{(SXB)^2}{nB} \right]$$

Il reste à calculer le rapport de variance F. Pour cela on calcule les carrés moyens (ou variances) pour les différentes sources de variation, en divisant les sommes des carrés par les degrés de liberté correspondants.

La valeur de F s'obtient en faisant le rapport des deux carrés moyens, en plaçant au numérateur le carré moyen le plus élevé. Il suffit alors de se reporter aux tables de F, indiquant les valeurs critiques de F pour les limites de probabilité de 5 %, de 1 % et de 1°/∞. Si la valeur de F trouvée est supérieure aux valeurs critiques pour les seuils de probabilité  $F = 0,05$ ,  $F = 0,01$  et  $F = 0,001$  on conclut que la différence observée entre les deux groupes A et B est significative, c'est à dire que la valeur de F trouvée est supérieure à la limite de probabilité  $P = 0,05$ ,  $P = 0,01$  ou  $P = 0,001$ .



### C H A P I T R E I I I

#### RESULTATS

#### 1) - DETERMINATION DE LA VALEUR DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE PAR ETUDE CINETIQUE DE LA DIFFUSION DU PHOSPHATE RADIOACTIF

Les résultats sont rassemblés dans la figure 2 et le tableau I.

Chez les animaux non traités la valeur moyenne de l'espace liquidien extra-cellulaire est de  $22,2 \pm 0,7$  ml/100g de poids de tissu à l'état frais, sous l'action de l'adrénaline la valeur passe à  $26,4 \pm 0,3$  ml. On constate que l'adrénaline provoque une augmentation très significative de l'espace extra-cellulaire ( $P < 0,001$ ).

#### T A B L E A U I

Valeurs normales et variations de l'espace extra-cellulaire du muscle latéral de la Truite arc-en-ciel d'élevage sous l'influence de la L.adrénaline.

Les valeurs sont exprimées en ml/100g de tissu à l'état frais.

| Méthode "in vitro" à 25°<br>par la méthode au $^{32}\text{P}$ | Nombre<br>d'animaux | $\bar{x} \pm \text{sm}^\circ$ | F     | F=0,001 | S $^{\circ\circ}$ |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|-------|---------|-------------------|
| Muscle Témoin                                                 | 7                   | $22,2 \pm 0,7$                | 27,31 | 19,69   | +++               |
| Muscle traité par la L<br>adrénaline $10^{-7}\text{M}$        | 6                   | $26,4 \pm 0,3$                |       |         |                   |

° moyenne suivie de l'erreur type.  
°° signification.

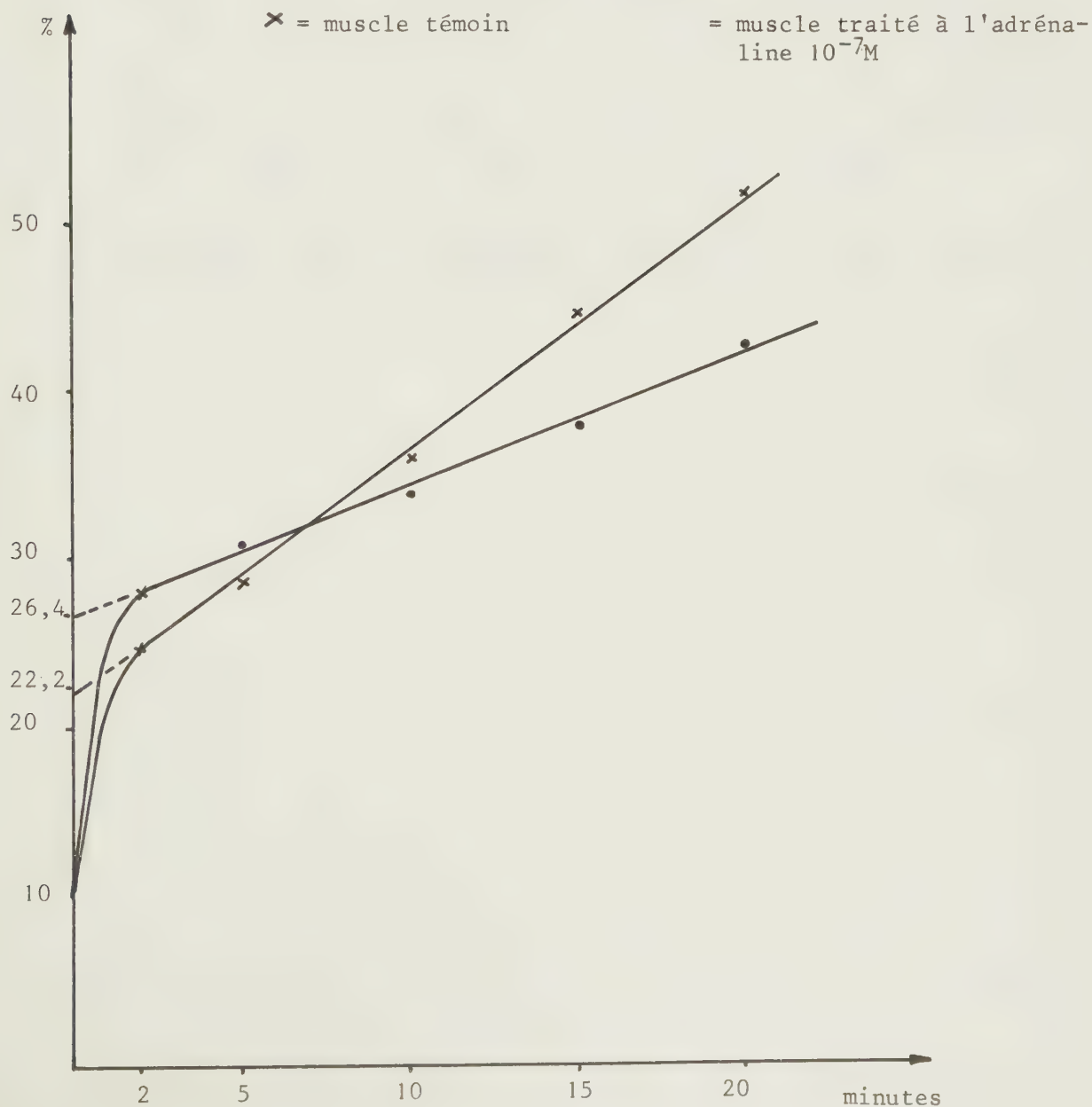


FIGURE 2

Détermination de l'espace extra-cellulaire par la diffusion du phosphate radioactif : Courbe cinétique de l'incorporation du phosphate radioactif dans le muscle latéral de la Truite.

En abscisses : temps d'incubation en minutes.

En ordonnées : radioactivité tissulaire en pourcentage de la radioactivité du milieu d'incubation.





2) - ETUDE DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE

Les résultats d'ensemble pour les diverses concentrations d'adrénaline employées, et pour les temps de contact utilisés, figurent dans le tableau II et l'analyse statistique des résultats dans le tableau III.

La valeur de l'espace de diffusion de l'inuline dans le muscle dorsal de la Truite "in vitro" est de  $22,4 \text{ ml} \pm 0,3/100\text{g}$  de poids de tissu à l'état frais. On constate qu'après un temps de contact de 10 minutes, l'adrénaline produit une augmentation très significative de l'espace de diffusion de l'inuline pour toutes les concentrations utilisées. L'effet maximum est obtenu avec la concentration de  $10^{-6}\text{M}$ , il représente une augmentation relative de l'espace de diffusion de l'inuline d'environ 30 %. L'augmentation la moins importante est observée avec l'adrénaline  $10^{-5}\text{M}$ .

On constate que pour une concentration donnée ( $10^{-7}\text{M}$  ou  $10^{-6}\text{M}$ ), le temps de contact, 10 minutes ou 30 minutes, n'a pas d'influence sur les résultats observés.



T A B L E A U I I

Action de l'adrénaline sur l'espace extra-cellulaire du muscle latéral de la Truite arc-en-ciel d'élevage.

Les valeurs sont exprimées en ml/100g de poids de tissu à l'état frais.

| Traitement                        | Concentrations<br>de l'adrénaline | Temps de<br>contact | Nombre<br>de mesure ° | Espace inuline<br>$\bar{x} \pm sm$ |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Muscle témoin                     | -                                 | -                   | 20 (5)                | 22,4 $\pm$ 0,3                     |
| Muscles traités<br>à l'adrénaline | 10 <sup>-7</sup> M                | 10 mn               | 20 (5)                | 27,2 $\pm$ 0,4                     |
|                                   | 10 <sup>-7</sup> M                | 30 mn               | 20 (5)                | 27,3 $\pm$ 0,5                     |
|                                   | 5 x 10 <sup>-7</sup> M            | 10 mn               | 20 (5)                | 28,0 $\pm$ 0,4                     |
|                                   | 10 <sup>-6</sup> M                | 10 mn               | 20 (5)                | 29,2 $\pm$ 0,4                     |
|                                   | 10 <sup>-6</sup> M                | 30 mn               | 20 (5)                | 29,0 $\pm$ 0,5                     |
|                                   | 5 x 10 <sup>-6</sup> M            | 10 mn               | 20 (5)                | 27,3 $\pm$ 0,4                     |
|                                   | 10 <sup>-5</sup> M                | 10 mn               | 20 (5)                | 24,9 $\pm$ 0,3                     |

°. le nombre d'animaux utilisés figure entre les parenthèses.



T A B L E A U I I I

Analyse statistique par analyse de variance des valeurs de l'espace inuliné dans le muscle traité à l'adrénaline.

|                                | 10 <sup>-7</sup> M<br>(10 mn) | 10 <sup>-7</sup> M<br>(30 mn) | 10 <sup>-6</sup> M<br>(10 mn) | 10 <sup>-5</sup> M<br>(10 mn) |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Muscle témoin                  | F = 90,87<br>+++              |                               |                               | F = 32,58<br>+++              |
| 10 <sup>-7</sup> M (30 mn)     | F = 0,006<br>-                |                               |                               |                               |
| 5 x 10 <sup>-7</sup> M (10 mn) | F = 1,49<br>-                 |                               |                               |                               |
| 10 <sup>-6</sup> M (10 mn)     | F = 12,59<br>++               |                               |                               |                               |
| 10 <sup>-6</sup> M (30 mn)     |                               | F = 5,54<br>+                 | F = 0,18<br>-                 |                               |
| 5 x 10 <sup>-6</sup> M (10 mn) | F = 0,01<br>-                 |                               |                               |                               |
| 10 <sup>-5</sup> M (10 mn)     | F = 22,27<br>+++              |                               |                               |                               |

signification P < 0,001 = +++

P < 0,01 = ++

P < 0,05 = +

P > 0,05 = -



Signalons que ces résultats correspondent à des expériences faite de décembre à avril, période pendant laquelle on rencontre des animaux en état d'activité sexuelle.

D'autres expériences effectuées aux mois de mai et juin (phase de repos sexuel) ne montrent aucune variation dans la valeur de l'espace inuline comme l'indique le tableau IV.

T A B L E A U   I V

Mesures de l'espace inuline effectuées à deux périodes différentes de l'année.

Les valeurs sont exprimées en ml/100g de poids de tissu à l'état frais. Le nombre de mesure et le nombre d'animaux utilisés sont indiqué entre parenthèses.

|                  | Muscle témoin               | Muscle traité à<br>l'adrénaline $10^{-7}M$ |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------------------|
| Mai - Juin       | $22,3 \pm 0,2$<br>(50 - 10) | $27,0 \pm 0,3$<br>(35 - 7)                 |
| Décembre - Avril | $22,4 \pm 0,3$<br>(20 - 5)  | $27,2 \pm 0,4$<br>(20 - 5)                 |

Ce facteur écologique n'a donc pas d'influence sur les résultats.



### 3) - MESURE DE L'EAU TOTALE

Les résultats figurent dans le tableau V.

La concentration moyenne en eau dans le muscle dorsal de la Truite après incubation est de  $81,7 \pm 0,1$  ml/100 g de poids de tissu à l'état frais.

On voit que la présence d'adrénaline ne modifie pas la valeur de l'eau totale dans les coupes de tissu musculaire "in vitro", quelle que soit la concentration utilisée.

T A B L E A U V

Valeur de l'eau totale dans le muscle latéral de la Truite arc-en-ciel d'élevage en présence d'adrénaline.

Les valeurs sont exprimées en ml/100 g de poids de tissu à l'état frais.

| Traitement                      | Concentration de l'adrénaline | Temps de contact | Nombre de mesure <sup>o</sup> | Eau totale<br>$\bar{x} \pm sm$ |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Muscle témoin                   | -                             | -                | 20 (5)                        | $81,7 \pm 0,1$                 |
| Muscle traité<br>à l'adrénaline | $10^{-7}$ M                   | 10 mn            | 20 (5)                        | $81,8 \pm 0,1$                 |
|                                 | $10^{-6}$ M                   | 10 mn            | 20 (5)                        | $81,8 \pm 0,2$                 |
|                                 | $10^{-5}$ M                   | 10 mn            | 20 (5)                        | $81,6 \pm 0,1$                 |

o le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses.



#### 4) - EFFETS DES SUBSTANCES ADRENOLYTIQUES

Les effets des substances adrénolytiques sur l'espace de diffusion de l'inuline dans le muscle traité par l'adrénaline (concentration  $10^{-7}M$ , temps de contact 10 minutes), sont représentées dans le tableau VI.

Dans le tableau VII figure l'analyse statistique des résultats.

On observe qu'en présence de propranolol à la concentration de 4 mg/l, l'espace extra-cellulaire est de  $25,8 \pm 0,4$  ml/100g de poids de tissu à l'état frais. Il existe donc une inhibition partielle de l'action de l'adrénaline. Le même phénomène est noté en présence de phentolamine à la concentration de 4 mg/l.

Dans ce cas la valeur obtenue est de  $25,1 \pm 0,3$  ml/100g de poids de tissu à l'état frais.

Lorsque les deux produits sont utilisés ensemble (propranolol 2mg/l + phentolamine 2 mg/l) l'espace inuline est de  $22,7 \pm 0,3$  ml/100g de poids de tissu à l'état frais. Dans ce cas on note donc une inhibition totale de l'effet de l'adrénaline.



T A B L E A U V I

Action de l'adrénaline sur l'espace extra-cellulaire du muscle latéral de la Truite arc-en-ciel d'élevage en présence des substances adrénolytiques.

Les valeurs sont exprimées en ml/100g de poids de tissu à l'état frais.

| Traitement                                                                                        | Nombre de mesures ° | Espace inuline<br>$\bar{x} \pm sm$ |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| muscle témoin                                                                                     | 20 (5)              | $22,4 \pm 0,3$                     |
| Muscle traité à l'adrénaline<br>$10^{-7}M$ 10 minutes                                             | 20 (5)              | $27,2 \pm 0,4$                     |
| Muscle traité au propranolol 4 mg/l<br>+ adrénaline $10^{-7}M$ 10 minutes                         | 20 (5)              | $25,8 \pm 0,4$                     |
| Muscle traité à la phentolamine 4 mg/l<br>+ adrénaline $10^{-7}M$ 10 minutes                      | 20 (5)              | $25,1 \pm 0,3$                     |
| Muscle traité au propranolol 2mg/l<br>+ phentolamine 2 mg/l<br>+ adrénaline $10^{-7}M$ 10 minutes | 20 (5)              | $22,7 \pm 0,3$                     |

° le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses.



T A B L E A U V I I

Analyse statistique par analyse de variance des valeurs de l'espace inuline dans le muscle traité à l'adrénaline en présence de substances adrénolytiques.

Signification     $P < 0,001$     =    +++  
                      $P < 0,05$         =    +  
                      $P > 0,05$         =    -

| Traitement                                  | Propranolol<br>+<br>adrénaline | Phentolamine<br>+<br>adrénaline | Propranolol<br>+<br>Phentolamine<br>+<br>adrénaline |
|---------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Muscle témoin                               | F = 53,63<br>+++               | F = 48,93<br>+++                | F = 0,55<br>-                                       |
| Adrénaline<br>10 <sup>-7</sup> M 10 minutes | F = 6,30<br>+                  | F = 17,89<br>+++                | F = 73,96<br>+++                                    |



## C H A P I T R E   I V

### INTERPRETATION DES RESULTATS

#### 1) - ETUDE DES ESPACES LIQUIDIENS DU TISSU MUSCULAIRE IN VITRO

##### 1) Mesure de l'espace extra-cellulaire

###### a) Techniques utilisées

Un travail antérieur effectué dans le laboratoire (75) avait pour but l'étude comparative de diverses méthodes de mesure de l'espace extra-cellulaire. Deux méthodes d'étude "in vitro" avaient été retenues : la mesure de l'espace de diffusion de l'inuline et l'étude cinétique de la diffusion du phosphate radioactif ; la détermination de l'espace inuline étant d'ailleurs considérée comme la méthode de référence par la plupart des auteurs. Pour l'étude de l'espace extra-cellulaire du muscle dorsal de la Truite, nous nous sommes limité à l'emploi de ces deux méthodes.

Les résultats obtenus avec ces deux techniques se recoupent parfaitement. Le fait d'obtenir des valeurs très voisines avec deux méthodes très différentes est sans doute le meilleur critère permettant de penser que l'on est parvenu à une détermination satisfaisante.

###### b) Conditions opératoires

La température d'incubation choisie est 25°. Cette température est très différente de celle que connaît la Truite dans son milieu naturel, cependant GRAS (40) a montré que la température de 25° correspondait "in vitro" à l'activité métabolique maximum du tissu musculaire de la Truite. Il était donc logique d'opérer à cette température.

Le temps d'incubation varie en fonction de la méthode. Pour la mesure de l'espace inuline il a été fixé à 70 minutes après une étude préliminaire de la diffusion de l'inuline en fonction du temps. (voir figure 1)



Pour l'étude cinétique de la diffusion du phosphate radio-actif, les temps au bout desquels s'effectuent les prélèvements ont été fixés après des expériences préliminaires : en effet le temps d'incubation doit être suffisamment court pour que l'on puisse saisir le passage progressif du phosphate dans les cellules. Dans cette méthode, il faut également tenir compte de l'épaisseur de la coupe de tissu : en effet si la coupe est trop épaisse, les résultats ne sont pas interprétables car la diffusion intra-cellulaire a lieu avant l'équilibration du traceur dans l'espace extra-cellulaire ; à l'inverse, si la coupe est trop fine, on obtient des valeurs élevées qui correspondent à une destruction des structures cellulaires.

c) Choix d'une technique pour l'étude de l'action de l'adrénaline

Nous avons préféré l'étude de l'espace de diffusion de l'inuline. Cette méthode permet de réaliser des mesures en série ce qui n'est pas possible avec la méthode au phosphate radio-actif car cette technique nécessite cinq prélèvements pour une seule mesure. D'autre part, il est plus simple d'utiliser la technique de diffusion de l'inuline lorsque l'on fait agir l'adrénaline pendant des temps différents. Enfin, le dosage du traceur se réalise beaucoup plus facilement.

2) Mesure de l'eau totale

Il faut noter sur ce point que les valeurs obtenues pour le muscle après incubation sont sensiblement plus élevées que celles notées pour le muscle non incubé (82). Il se produit un phénomène de gonflement qui s'observe constamment dans les expériences "in vitro".

2) - ACTION DE L'ADRENALINE SUR LES SECTEURS LIQUIDIENS DU TISSU MUSCULAIRE

L'augmentation de l'espace extra-cellulaire sous l'influence de l'adrénaline a été constaté par différents auteurs (15 - 37 - 66) sur divers tissus provenant d'espèces animales différentes. Ces études avaient été entreprises en vue de préciser l'action de l'adrénaline sur les mouvements ioniques. HENRY, PERRIER et GRAS (43) ont étudié le phénomène sur l'aorte de Lapin ; l'augmentation de l'espace extra-cellulaire dans ce tissu, corroborée par un oedème observé histologiquement (4) est sans doute un aspect très important de l'action de l'adrénaline sur le tissu vasculaire.

En reprenant cette étude sur le tissu musculaire de la Truite, notre but était de retrouver ce type d'action de l'adrénaline chez les Poissons.



En outre, le muscle de truite par sa structure, permettait de réaliser dans les meilleures conditions et à peu de frais une étude complète du phénomène. Il était en effet important de savoir, si l'augmentation de l'espace de diffusion de l'inuline correspondait bien à une augmentation de l'espace liquidien extra-cellulaire et non à une pénétration intra-cellulaire du traceur, cette possibilité ayant été envisagée par SOMLYO (93). Pour savoir si l'augmentation de la concentration de l'inuline dans le tissu correspondait ou non à une action toxique de l'adrénaline sur la perméabilité cellulaire, nous avons entrepris une étude sur l'effet, à des temps de contact différents, de concentration croissantes d'adrénaline.

Les résultats obtenus montrent que l'effet de doses croissantes d'adrénaline sur l'espace de diffusion de l'inuline peut être représenté par une courbe en cloche (figure 3). A la dose de  $10^{-7}$  M l'effet est très marqué et l'espace de diffusion est augmenté d'environ 20 % ce que confirme la cinétique de diffusion du phosphate radioactif. L'effet maximum est obtenu avec une concentration de  $10^{-6}$  M (augmentation relative d'environ 30 %). Avec des doses plus fortes,  $5 \cdot 10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M, l'effet est moins marqué. Ces faits semblent bien indiquer que l'adrénaline ne modifie pas l'imperméabilité de la membrane cellulaire vis à vis de l'inuline.

Pour une même dose d'adrénaline,  $10^{-7}$  M ou  $10^{-6}$  M, les résultats montrent que le temps de contact avec l'adrénaline, 10 ou 30 mn, ne modifie pas la valeur de l'espace de diffusion de l'inuline (voir tableau II). Ceci permet de dire que l'augmentation de l'espace de diffusion de l'inuline correspond bien à une augmentation de l'espace extra cellulaire et non à une pénétration intra-cellulaire du traceur.

Les résultats des mesures de l'eau totale dans le tissu musculaire (voir tableau V) montrent que l'adrénaline ne modifie pas la teneur globale en eau du tissu. Ceci indique que l'oedème provoqué par l'adrénaline résulte d'un passage d'eau cellulaire dans les espaces intersticiels et non pas d'un apport d'eau externe.

### 3) - EFFETS DES SUBSTANCES ADRENOLYTIQUES SUR L'AUGMENTATION DE L'ESPACE EXTRA CELLULAIRE INDUIT PAR L'ADRENALINE

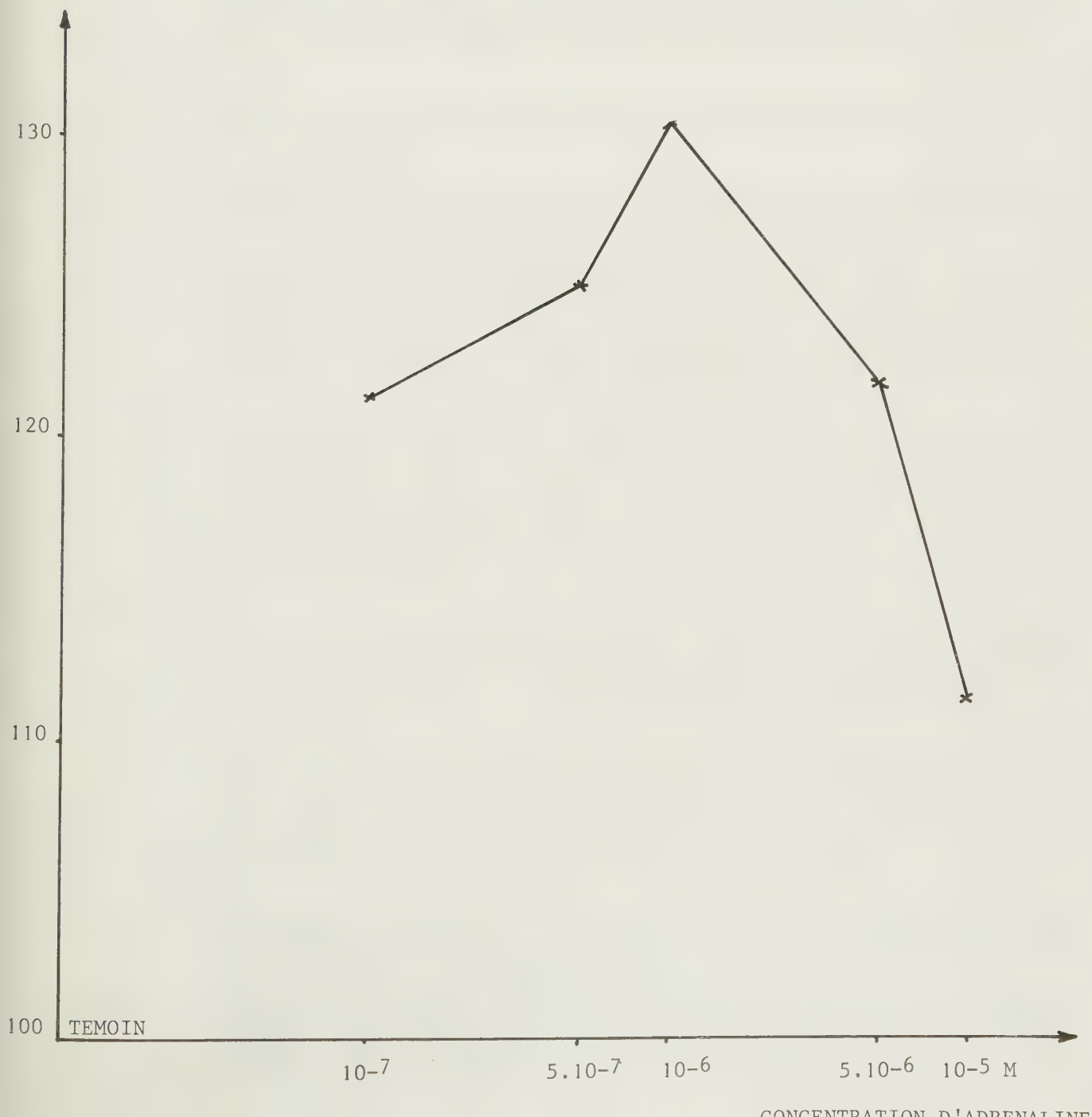
Sur la base d'activité comparée de diverses amines : Adrénaline, noradrénaline et Isopropyl noradrénaline, AHLQUIST (1, 2) avait établi en 1948, une classification des récepteurs adrénérgiques en deux types : récepteurs  $\alpha$  et récepteurs  $\beta$ . Cependant les substances sympatholytiques n'étaient actives que sur les effets du type  $\alpha$ . La théorie d'AHLQUIST s'est trouvée par la suite confirmée par la découverte de drogues susceptibles d'agir au niveau des récepteurs  $\beta$ .

Actuellement, les progrès de la Biochimie cellulaire et de la Pharmacologie font qu'il est difficile de conserver la valeur précise qui avait été attribuée à la notion de récepteurs  $\alpha$  ou  $\beta$  par AHLQUIST ; cependant la notion d'effet  $\alpha$  ou  $\beta$  reste un moyen commode de notation des effets globalement observés.



FIGURE 3

Représentation des variations relatives de l'espace inuline sous l'influence de concentrations croissantes d'adrénaline.  
Les moyennes arithmétiques sont comparées à la moyenne pour les témoins rapportée à 100.





En ce qui concerne l'augmentation de l'espace extra-cellulaire, aucun travail n'avait été réalisé visant à relier cet effet de l'adrénaline à la classification d'ÅHLQUIST.

Les expériences que nous avons réalisées comprennent d'abord une incubation du tissu en présence des substances adrénolytiques étudiées, suivi de l'addition d'adrénaline pour avoir une concentration de  $10^{-7}M$ , le temps de contact avec l'adrénaline étant de 10 minutes.

Les résultats obtenus permettent de dégager les faits suivants (voir tableau VI) :

- L'effet de l'adrénaline est inhibé partiellement en présence de phentolamine (inhibiteur  $\alpha$ ) ou de propranolol (inhibiteur  $\beta$ ).
- Lorsque ces deux produits sont utilisés en même temps, l'inhibition de l'action de l'adrénaline est totale. En conclusion de ces travaux, on peut dire qu'il existe dans le tissu musculaire de la Truite deux types de récepteurs adrénérgiques que l'on peut distinguer par l'emploi des substances adrénolytiques spécifiques.

Ces deux types de récepteurs réagissent de façon identique . Cette dernière constatation explique pourquoi nous n'avons pas employé, pour l'étude des récepteurs adrénérgiques, la méthode d'activité comparée d'ÅHLQUIST (1).

Il est particulièrement intéressant de rapprocher les résultats que nous avons obtenus dans le muscle de Truite, des travaux figurant dans la littérature.

Ainsi l'adrénaline provoque une augmentation de l'espace extra-cellulaire dans le muscle utérin de Rate (66) qui contient uniquement des récepteurs  $\beta$  (2) ; et un effet identique a été constaté dans l'aorte de Lapin (43) qui ne renferme que des récepteurs  $\alpha$  (2).

On voit que les différents types de récepteurs réagissent de la même façon, ceci étant en parfait accord avec les observations que nous avons faites sur le muscle de Truite ; on peut donc penser que l'augmentation de l'espace extra-cellulaire dans les tissus musculaires, est un effet très général de l'adrénaline.

On doit enfin signaler le travail récemment publié de HETTIARATCHI et PICKFORD (45) bien que ces auteurs utilisent des conditions expérimentales très différentes des nôtres.

Ils ont constaté que l'adrénaline provoque une augmentation du volume extra-cellulaire corporel chez le Chien. En présence de phentolamine ou de pronethalol, l'adrénaline n'a aucun effet, ou provoque même parfois une diminution du volume extra-cellulaire.



Il est évidemment malaisé de comparer ces expériences réalisées "in vivo", dans lesquelles intervient le rôle vaso presseur de l'adrénaline et de plus concernant le volume extra-cellulaire corporel, avec nos expériences mesurant l'espace extra-cellulaire d'un tissu, isolé, "in vitro".

On peut cependant noter dans les deux cas que l'adrénaline a la même action globale et que les deux types de substances adrénolytiques  $\alpha$  et  $\beta$  ont un effet inhibiteur du même ordre.



D E U X I E M E P A R T I E

---

ETUDE DE CERTAINS EFFETS METABOLIQUES  
DE L'ADRENALINE CHEZ LA TRUITE "IN VIVO"



## C H A P I T R E I

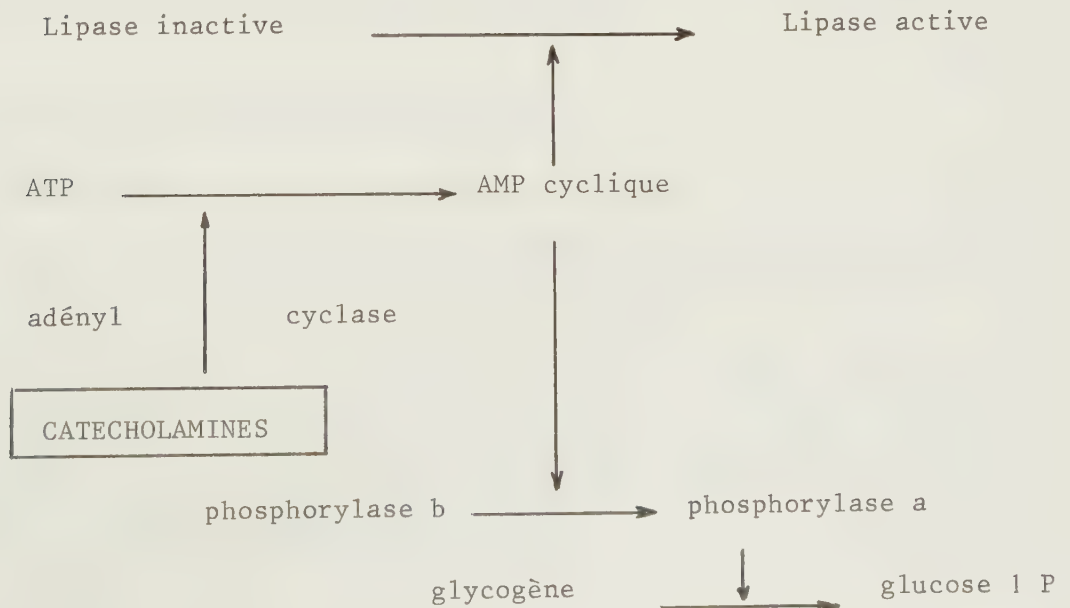
### GENERALITES SUR LES EFFETS METABOLIQUES DES CATECHOLAMINES

#### 1) - LES EFFETS METABOLIQUES DES CATECHOLAMINES CHEZ LES MAMMIFERES

Ce sujet a donné lieu a un nombre considérable de travaux et une bibliographie complète comprendrait certainement plusieurs milliers de références. Ce chapitre étant dans notre esprit simplement destiné à rappeler des processus métaboliques bien établis, nous nous sommes inspiré pour sa rédaction de plusieurs revues générales où l'on pourra trouver des références bibliographiques détaillées (41, 47, 92)

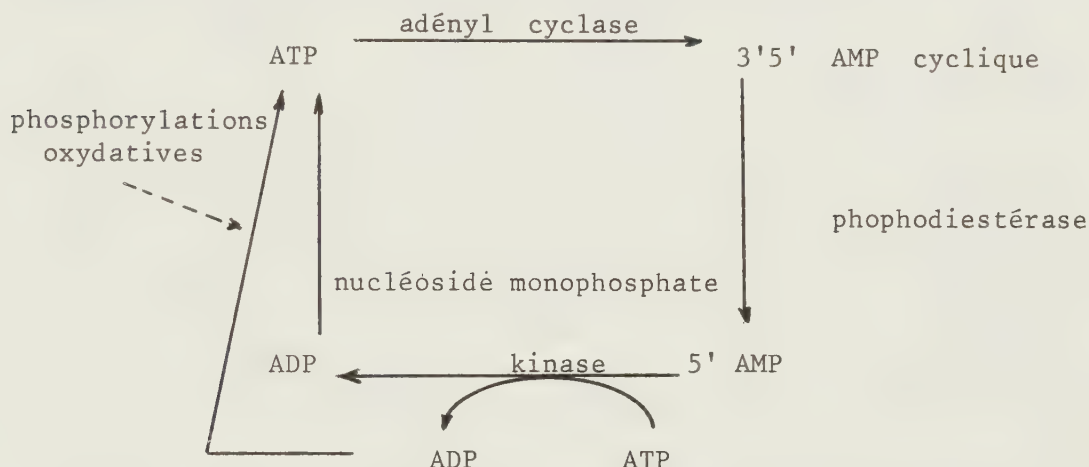
Nous n'envisagerons ici que les effets des catécholamines sur les métabolismes lipidique, glucidique et protidique, seuls points étudiés dans notre travail expérimental.

La plupart des effets métaboliques de l'adrénaline résultent d'une activation de l'adényl cyclase que l'on peut résumer ainsi :





Les travaux de SUTHERLAND, RALL et BUTCHER (16, 17, 83, 95, 96) ayant abouti à l'isolement de l'adényl 3'5' monophosphate cyclique (AMP cyclique) ont mis en évidence le rôle de deuxième messenger de ce nucléotide. Il se forme à partir de l'ATP. Il sera ensuite retransformé en ATP (cycle des nucléotides adényliques) :



En plus de la lipase et de la phosphorylase, nombre d'autres systèmes enzymatiques sont activés par l'AMP cyclique (83). D'autre part, l'activation de l'adénylcyclase semble être un processus général d'action des hormones (18, 97). La spécificité de l'action hormonale résulterait de la sensibilité particulière des multiples formes de l'adényl cyclase (iso-enzymes), suivant les organes cibles et de la capacité métabolique des cellules. L'adényl cyclase est localisée au niveau de la membrane cellulaire.

#### ACTION SUR LE METABOLISME DES LIPIDES

##### "In vitro"

Les catécholamines stimulent l'hydrolyse des triglycérides dans le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cœur et le foie. L'action sur le tissu adipeux a été la mieux étudiée.

L'accumulation du glycérol permet de mesurer l'hydrolyse, mieux que l'accumulation des acides gras libres qui peuvent être en partie réestérifiés. L'importance de la lipolyse varie suivant le tissu étudié et les conditions expérimentales. L'action de l'adrénaline et de la noradrénaline se fait par l'intermédiaire de l'AMP cyclique qui active la triglycéride lipase.



### "In vivo"

Après l'injection d'adrénaline ou de noradrénaline, on constate une augmentation des taux sanguins de glycérol et d'acides gras libres ; cela résulte d'une augmentation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux. Un autre facteur moins important est la diminution de la sécrétion d'insuline (inhibiteur de la lipolyse), par action directe sur le pancréas. La perfusion intra-veineuse d'adrénaline chez le Chien, produit une augmentation transitoire des acides gras libres dans le sang, mais le taux revient rapidement à la normale. La noradrénaline, par contre, a un effet prolongé aussi longtemps que dure la perfusion. Cette différence est probablement imputable à l'effet plus marqué de l'adrénaline sur la glycémie ; le passage des acides gras libres dans le sang est diminué par suite de l'augmentation de la concentration du glucose qui favorise la réesterification des acides gras libres dans le tissu adipeux. A l'appui de cette thèse, on note que le taux de glycérol est augmenté de façon prolongée lors de l'administration d'adrénaline.

L'adrénaline et la noradrénaline provoquent aussi une augmentation du taux d'autres lipides plasmatiques (triglycérides, phospholipides, cholestérol), mais plus tardivement. Le phénomène est observé d'une façon générale pour les diverses espèces animales étudiées (7, 19, 27, 36) en ce qui concerne les phospholipides et le cholestérol, mais d'une façon inconstante pour les triglycérides (87, 88, 89). Ces modifications seraient dues à l'augmentation primitive des acides gras libres. A partir des acides gras libres, le foie synthétise des triglycérides et des phospholipides ; pendant la perfusion, ces composés s'accumulent dans le foie, probablement parce que l'adrénaline inhibe la sécrétion des VLDL (very low density lipoprotéines). Après l'arrêt de la perfusion, la triglycéridémie augmente lentement. L'hypercholestérolémie résulte sans doute d'une modification de la sécrétion des lipoprotéines, la biosynthèse elle-même, étudiée avec de l'acétate marqué, n'étant pas modifiée (34). Après une perfusion prolongée on constate également, une accumulation de triglycérides dans le coeur et le muscle squelettique ; dans le tissu adipeux lui-même, la synthèse des triglycérides est secondairement augmentée. Ceci peut être montré, "in vitro", par l'étude du rapport acides gras libres / glycérol dans le milieu ; le rapport est inférieur à trois, ce qui indique une réesterification. On peut supprimer la libération des acides gras libres induite par l'adrénaline en utilisant un milieu d'incubation suffisamment riche en glucose, sans que la libération de glycérol soit altérée.

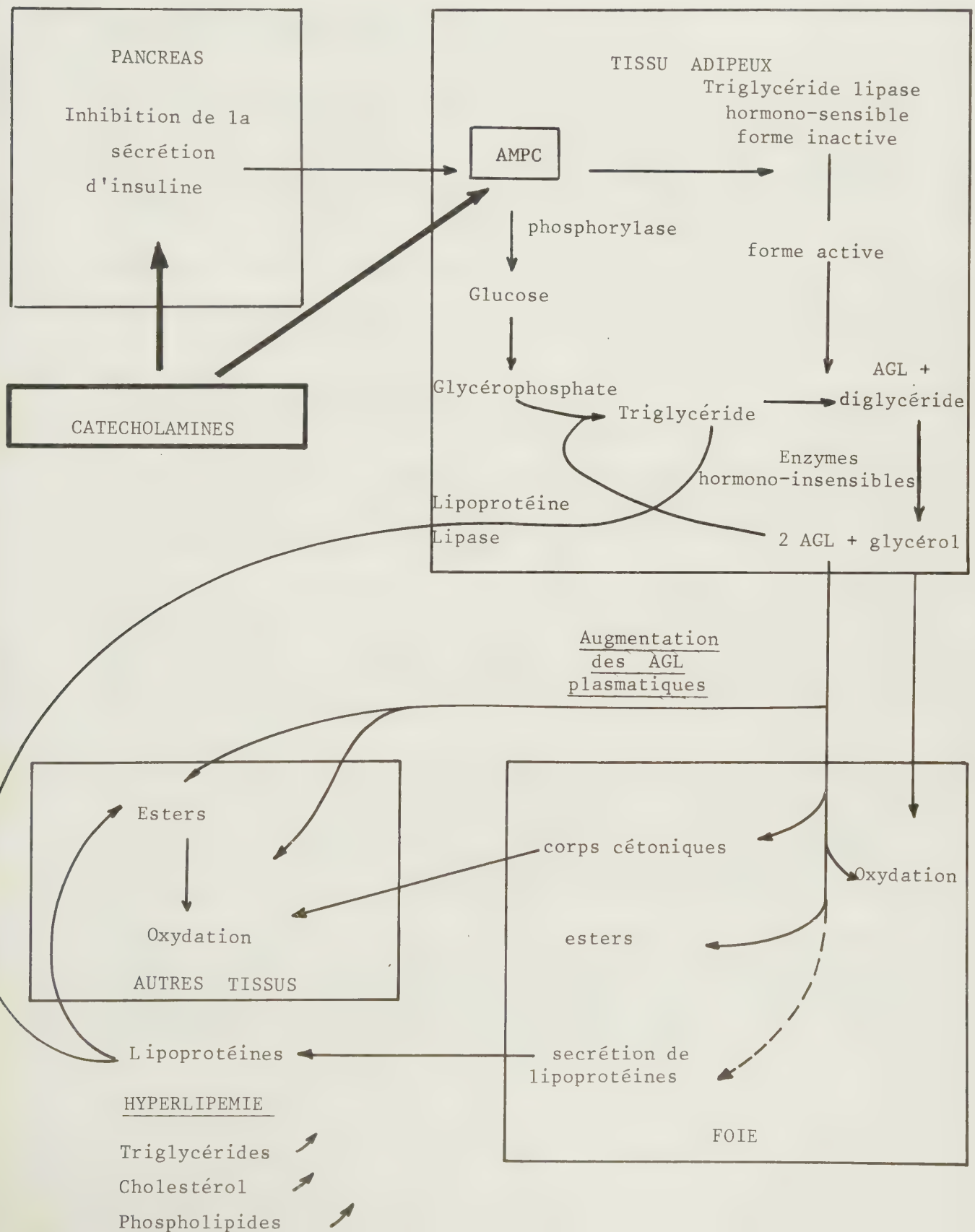
Sous l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline, il y a augmentation de l'oxydation des acides gras qui est à rapporter à l'augmentation de la quantité d'acides gras libres mise à la disposition des tissus.



La conséquence est une augmentation de la production des corps cétoniques. On sait que ces composés sont utilisables par certains tissus et en particulier par le tissu myocardique. Une vue d'ensemble de l'action des catecholamines au niveau du métabolisme lipidique est représentée page 47.



Représentation schématique de l'effet des catécholamines sur le transport et l'utilisation des acides gras d'après STEINBERG (94).





## ACTION SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE

Les catécholamines peuvent modifier au moins deux voies du métabolisme glucidique. L'activation de l'adényl cyclase, produit une augmentation transitoire de l'AMP cyclique qui modifie l'activité de la phosphorylase, de la glycogène synthétase et aussi d'autres enzymes. En plus les catécholamines interviennent de façon indirecte : augmentation des acides gras libres, diminution de la sécrétion d'insuline.

### Action au niveau des organes isolés

L'action directe des catécholamines a été démontrée dans le muscle strié, le coeur, le muscle lisse, le foie et le tissu adipeux.

#### Dans le muscle squelettique

L'augmentation de l'AMP cyclique produit une activation de la phosphorylase et une inhibition de la glycogène synthétase.

La phosphorylase existe sous deux formes interconvertibles : a et b. Celle-ci prédomine dans le muscle au repos ; elle est activée par le 5' AMP et inactivée par l'ATP et le glucose 6 phosphate. La phosphorylase a est activée même en l'absence de 5' AMP.

La forme b est transformée en forme a par un enzyme qui est la déphosphophorylasekinase ; celle ci est activée par l'AMP cyclique. Deux molécules de forme b donnent une molécule de forme a. Le retour de la forme a à la forme b se fait sous l'action d'une phosphatase. Ceci montre que l'adrénaline, par l'intermédiaire de l'AMP cyclique agit sur un système qui a sa propre régulation.

La glycogène-synthétase existe sous deux formes interconvertibles : I et D. La forme D inactive, est activée par le glucose 6 phosphate. La forme I est active même en l'absence de glucose 6 phosphate. La forme I est transformée en forme D par une kinase, la transformation inverse se fait sous l'influence d'une phosphatase. L'AMP cyclique accélère l'action de la kinase. La régulation semble se faire par le taux de glycogène qui aurait une action inhibitrice sur la phosphatase.

L'étude de l'influence de l'adrénaline sur la glycolyse dans le muscle a donné des résultats contradictoires. Il semble que la glycolyse soit accélérée, mais l'augmentation de l'acide lactique serait peut-être due à l'augmentation de la concentration en acides gras libres qui inhibent le métabolisme du pyruvate et le transforme en lactate.



#### Dans le coeur

L'augmentation de la concentration de l'AMP cyclique est rapide de même que l'augmentation de l'activité de la phosphorylase b kinase. D'autres effets de l'adrénaline sont secondaires aux changements de concentrations des nucléotides adényliques qui suivent l'effet inotrope : diminution de l'ATP et augmentation de l'ADP, de l'AMP et du phosphate. Ceci conduit à une activation de la phosphofructo-kinase et à une augmentation de la glycolyse. Le contrôle est ensuite rétabli par l'augmentation du citrate qui inhibe la phosphofructo-kinase. Avec une dose faible d'adrénaline, provoquant un effet inotrope, l'utilisation du glucose est modifiée sans altération du métabolisme du glycogène. Une action aussi marquée sur le métabolisme des glucides pourrait permettre au muscle cardiaque de subvenir à l'augmentation de travail causé par l'adrénaline. Mais il ne faut pas oublier que le principal carburant pour le coeur, est constitué par les lipides. L'adrénaline accélère le catabolisme des lipides dans le coeur.

#### Au niveau du muscle lisse

Dans des bandelettes longitudinales de l'intestin de cobaye, l'adrénaline provoque le relâchement du muscle et une augmentation de l'AMP cyclique. L'activité de la phosphorylase augmente plus tardivement. La corrélation entre le relâchement et l'AMP cyclique n'est pas établie de façon certaine. L'augmentation de l'acide lactique aurait un rôle ; pour BÜLBRING (15) le rôle principal reviendrait à la stimulation de la pompe à sodium augmentant le potentiel de membrane.

#### Dans le Foie

L'augmentation de l'AMP cyclique entraîne l'augmentation de l'activité de la phosphorylase (l'enzyme hépatique diffère de l'enzyme musculaire : la forme b est complètement inactive même en présence de 5' AMP ; elle est activée sans doublement du poids moléculaire). Il s'ensuit une augmentation de la glycogénolyse et de la sortie du glucose de la cellule. Un autre processus de production du glucose est la gluconéogenèse à partir du lactate, qui est aussi accélérée par l'AMP cyclique. Le point de contrôle de la gluconéogenèse n'est pas très bien défini. Plusieurs enzymes sont sûrement intéressés. Il peut s'agir soit d'une action directe de l'AMP cyclique ou, plus sûrement, d'une action secondaire due avec changements dans la concentration d'activateurs et d'inhibiteurs de divers enzymes, pouvant être la conséquence des modifications du métabolisme des lipides.

#### Dans le tissu adipeux

L'adrénaline active la phosphorylase et aussi la phosphofructo-kinase. Il y a augmentation de la glycolyse et de la formation d'alpha glycéro-phosphate, nécessaire à la synthèse des triglycérides. La cause principale de ces changements est certainement l'augmentation des acides gras libres.



### Chez l'animal entier

- L'injection d'adrénaline augmente les taux de lactate et de pyruvate dans le sang. Ceci est la conséquence de l'action glycogénolytique dans le muscle ; la noradrénaline n'a pas cet effet et elle n'augmente pas la lactacidémie. L'inhibition de l'utilisation de pyruvate par les acides gras libres est aussi une explication.

- Hyperglycémie.

Le mécanisme de l'hyperglycémie adrénalinique est extrêmement complexe. La perfusion intraveineuse d'adrénaline provoque une élévation persistante de la glycémie jusqu'à l'arrêt de la perfusion. Dans les mêmes conditions, avec la noradrénaline, on n'observe qu'une élévation faible et transitoire. Au moins cinq actions différentes de l'adrénaline sont impliquées dans son effet hyperglycémiant. (Voir schéma, page 51)

Dans le foie, la phosphorylase est activée, il s'ensuit un accroissement de la libération de glucose. L'adrénaline accélère aussi la gluconéogenèse à partir du lactate. Au niveau du muscle l'adrénaline provoque l'augmentation de la formation de lactate qui est utilisé par le foie pour la gluconéogenèse.

Dans le tissu adipeux, l'adrénaline augmente la libération des acides gras libres ce qui modifie l'utilisation du glucose et augmente la gluconéogenèse hépatique.

Au niveau du pancréas, l'adrénaline inhibe la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Au niveau de l'anté hypophyse, l'adrénaline stimule la sécrétion d'ACTH qui active la synthèse des glucocorticoïdes, lesquels vont activer la gluconéogenèse.

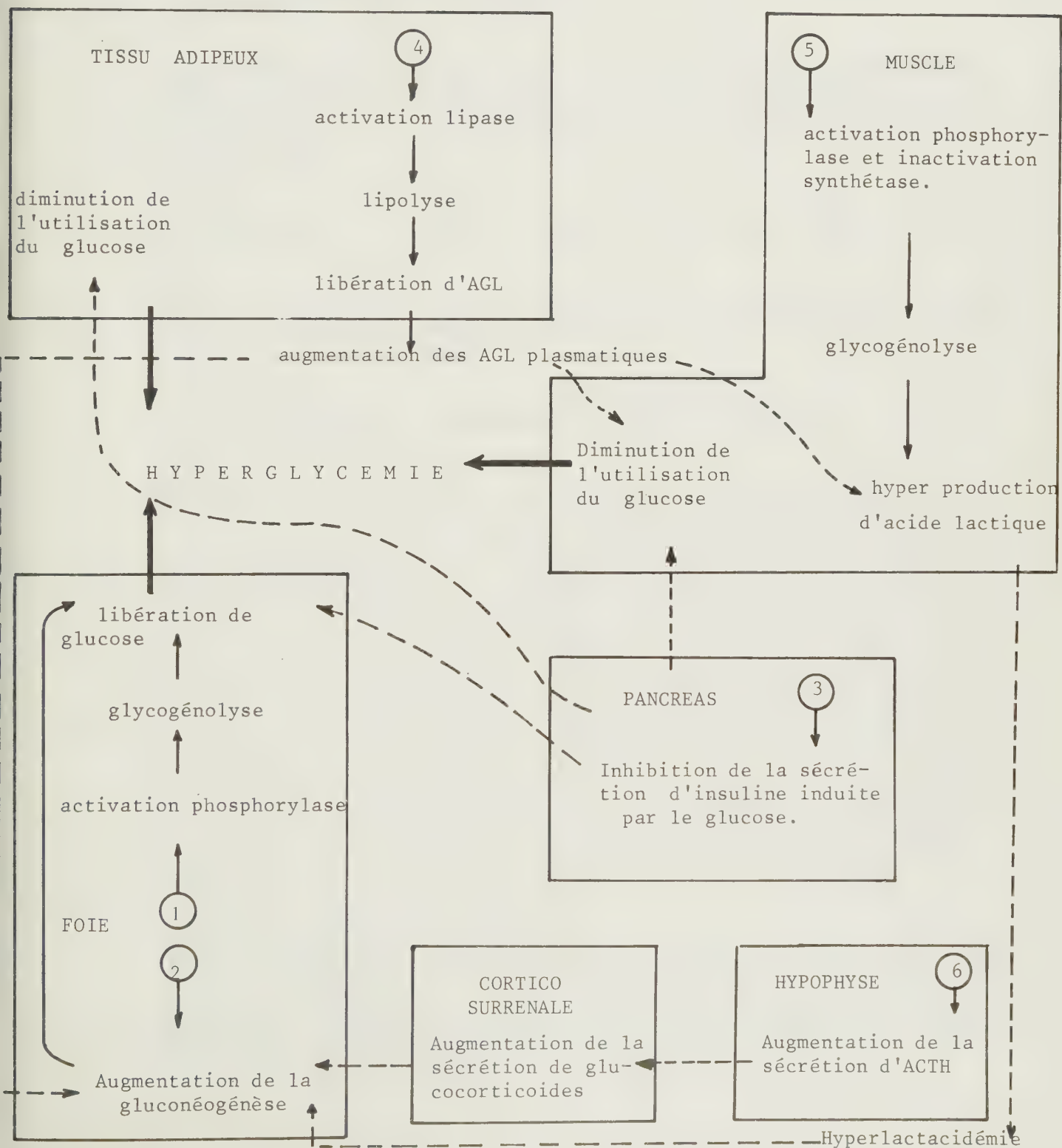
### ACTION SUR LE METABOLISME PROTIDIQUE

Dans ce domaine le nombre de travaux est beaucoup plus limité. Une action bien connue est l'inhibition de l'incorporation des acides aminés dans les protéines (l'AMP cyclique a le même effet). "In vivo" il a en général été constaté une diminution de l'acidoémie dont l'explication logique serait une activation de la néoglucogénèse mais ce fait n'a pas été prouvé.

Une étude récente fait chez le Rat (53) montre au contraire une augmentation du taux des acides aminés libres sanguins et diverses modifications dans les tissus ; les auteurs ne proposant pas d'explication globale des phénomènes observés.



Résumé des différents facteurs pouvant être impliqués dans l'effet hyperglycémiant des catécholamines d'après HIMMS-HAGEN (47).





## 2) - LES SUBSTANCES ADRENOLYTIQUES ET LES EFFETS METABOLIQUES - ESSAI DE CLASSIFICATION DES RECEPTEURS

Les substances adrénolytiques sont des antagonistes spécifiques inhibant l'action de l'adrénaline au niveau du récepteur ; le récepteur étant la structure cellulaire ou le site moléculaire avec lesquels les molécules des substances adrénérgiques réagissent pour faire naître la réponse caractéristique.

Les substances adrénolytiques se répartissent en deux groupes :  $\alpha$  et  $\beta$  lytiques selon que leur action s'exerce au niveau des récepteurs  $\alpha$  ou  $\beta$  définis selon la conception d'ÅHLQUIST (1 - 2).

Parmi les substances  $\alpha$  lytiques on trouve (38) soit des produits naturels : dihydroergotamine, yohimbine ...; soit des produits de synthèse : phénoxybenzamine, tolazine, phentolamine ...

Les inhibiteurs des récepteurs  $\beta$  sont tous des produits de synthèse : dichloro isoprotérénol, pronéthanol, propranolol, pindolol ...

De nombreux travaux ont eu pour but d'étudier l'action des substances adrénolytiques sur les divers effets métaboliques des catécholamines en vue d'étendre à ces effets la classification proposée par ÅHLQUIST (1 - 2). La classification en récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  semble difficile à appliquer aux effets métaboliques. Les résultats sont variables suivant l'espèce animale et suivant le tissu considéré dans une même espèce, l'effet métabolique étant le même. D'autre part il existe fréquemment des difficultés tenant au fait qu'un effet métabolique peut résulter de la somme de plusieurs actions qui sont inhibées à des degrés divers. C'est le cas, par exemple, de l'hyperglycémie. Enfin, la méthode de détermination d'activité comparée des catécholamines est souvent inutilisable (ainsi la noradrénaline n'a qu'une partie de l'effet de l'adrénaline pour produire l'hyperglycémie). Pour un effet métabolique simple il est toujours possible d'assigner aux récepteurs le type  $\alpha$  ou  $\beta$ . Cependant vu les variations d'un tissu à l'autre pour le même effet, ou d'une espèce animale à l'autre pour un même tissu, une classification générale est impossible. Nous donnerons seulement quelques exemples pour illustrer la complexité de cette question.

### - Au niveau du pancréas

L'effet inhibiteur de l'adrénaline sur la sécrétion d'insuline est bloqué par la phentolamine : on peut donc considérer cet effet comme dépendant des récepteurs  $\alpha$  ; mais l'isopropyl-noradrénaline stimule la sécrétion d'insuline (ce qui est une raison de l'absence d'effet hyperglycémiant) et cette action est inhibée par les  $\beta$  bloquants.



- L'activation de la phosphorylase, dans le muscle cardiaque, est sous la dépendance d'un récepteur  $\beta$ . Les activités comparées par ordre décroissant sont : isopropyl noradrénaline - adrénaline-noradrénaline ; elles sont inhibées par les  $\beta$  bloquants (61). Il en est de même pour les phosphorylases musculaires et hépatiques. Mais dans le foie de rat perfusé, le pré-traitement par la dhydroergotamine empêche l'hyperglycémie induite par l'adrénaline et l'AMP cyclique. Le dichloroisoprotérénol s'oppose à l'hyperglycémie adrénalinique, mais n'altère pas la réponse à l'AMP cyclique (69, 70). Les inhibiteurs  $\beta$  empêcheraient la formation de l'AMP cyclique et les inhibiteurs  $\alpha$  empêcheraient son action.
- Dans le tissu adipeux, tous les agents utilisés bloquent plus ou moins l'effet lipolytique. Les  $\beta$  bloquants agiraient par inhibition compétitive et les  $\alpha$  bloquants par inhibition non compétitive. En effet, la phentolamine s'oppose à l'effet de l'AMP cyclique déjà formé, alors que le dichloroisoprotérénol inhibe la formation d'AMP cyclique. Ceci a été montré par l'étude de l'activité de ces drogues pour inhiber l'effet activateur sur la lipolyse de la théophylline, un inhibiteur de la phosphodiesterase.

La structure requise pour l'activation de la libération des acides gras libres diffère de celle nécessaire à la stimulation de la glycogénolyse. Pour la lipolyse sont essentiels : le groupement  $\beta$  hydroxyl et la fonction phénol en para ; le groupement phénolique en méta est peu important, le groupement aminé peut être primaire ou secondaire. Pour la glycogénolyse : les deux groupements phénoliques sont essentiels ; l'amine secondaire est beaucoup plus active que l'amine primaire.

Ces différences ont amené LANDS et Coll. (5, 65), en comparant les potentialités relatives d'un grand nombre d'amines sympathomimétiques, à distinguer 2 types de récepteurs  $\beta$  :  $\beta_1$  et  $\beta_2$ .

Les récepteurs  $\beta_1$  seraient responsables de la lipolyse et de l'excitation cardiaque. Les récepteurs  $\beta_2$  interviendraient dans la glycogénolyse musculaire et hépatique, la bronchodilatation, la vasodilatation.

Il faut rappeler que la théorie d'ÅHLQUIST (1 - 2) sur les récepteurs adrénergiques correspondait à l'impossibilité dans laquelle les chercheurs se trouvaient de définir un site précis d'action des catécholamines. Les progrès de la biochimie cellulaire ont permis d'assimiler le terme de récepteur à une molécule enzymatique.

L'adényl cyclase est considéré comme correspondant au récepteur  $\beta$  (18) ; la nature du récepteur  $\alpha$  est encore hypothétique, il pourrait s'agir d'une ATPase membranaire (79).



Les multiples variations observées en ce qui concerne les effets métaboliques font supposer l'existence de nombreux types de récepteurs qui pourraient être différents isoenzymes, répartis en proportions variables selon les tissus (47). Enfin, il faut considérer que la réponse d'un tissu dépend du récepteur c'est à dire du site de combinaison primaire de l'agoniste mais aussi et surtout de la capacité métabolique des cellules. A ce sujet il faut signaler l'intéressante expérience de KUNOS et SZENTIVANYI (52). Ces auteurs ont montré qu'en changeant les conditions de milieu on pouvait changer les réponses vis à vis des substances adrénolytiques. Ainsi le coeur de la grenouille en hiver se comporte comme un récepteur  $\alpha$ , mais s'il est perfusé à 32°, la sensibilité à la phentolamine disparaît et l'effet inotrope est alors bloqué par le propranolol comme c'est le cas chez la grenouille d'été. De la même façon le coeur de grenouille d'été s'il est refroidi perd sa sensibilité au propranolol et devient sensible à la phentolamine. (il en est de même pour le coeur de rat). Ceci montre que les différences dans l'action de l'adrénaline seraient surtout influencées par l'activité métabolique des organes et les auteurs concluent à la valeur tout relative de la distinction entre  $\alpha$  et  $\beta$  récepteurs.

Pour LABORIT (54) les divers types de réponses à l'adrénaline seraient essentiellement sous la dépendance de la "structure métabolique" des tissus considérés. Cet auteur pense que les drogues agissent sur la structure spatiale des molécules enzymatiques pour en activer ou en inhiber la fonction en se fixant sur un point précis de la molécule. Si la molécule fait partie d'une chaîne métabolique l'ensemble du processus est perturbé. Le récepteur serait unique et la réponse fonctionnelle dépendrait uniquement de la "structure métabolique" des cellules.

On voit donc qu'il est difficile de conserver la valeur précise qui avait été attribuée à la notion de récepteur  $\alpha$  ou  $\beta$ , cependant la notion d'effet  $\alpha$  et  $\beta$  garde tout son intérêt du point de vue pratique.



### 3) - LES EFFETS METABOLIQUES DES CATECHOLAMINES CHEZ LES POISSONS

Les effets physiques des catécholamines chez les Poissons ne diffèrent pas de façon fondamentale de ceux observés chez les Mammifères. Il existe toutefois certaines particularités dans le mode de réponse traduisant une moindre sensibilité des effecteurs :

- temps de réponse assez long,
- nécessité de fortes doses,
- défaut de réponse qui est à relier à l'importante quantité de catécholamines qui est stockée par certains organes.

Ces effets ont été assez largement étudiés et l'on pourra trouver des références détaillées dans une revue bibliographique de FÄNGE (28) sur la réactivité pharmacologique Poïkilothermes.

En ce qui concerne les actions métaboliques des catécholamines, le nombre de travaux est beaucoup plus restreint. Ils ont porté essentiellement sur l'effet hyperglycémiant et sur l'effet lipolytique.

#### - Action sur le métabolisme des glucides

L'hyperglycémie adrénalinique chez les Poissons est connue depuis longtemps ; des études ont été effectuées chez diverses espèces : la Carpe (29 - 62), la Brème et la Perche (30), la Tanche (24), la Roussette (74), la Lamproie (8). Dans certains cas la courbe d'hyperglycémie présente un aspect biphasique (62 - 74).

Le mécanisme de cette hyperglycémie est certainement différent de celui que l'on connaît chez les Mammifères mais il n'est pas encore complètement élucidé. En effet, on ne constate pas généralement de diminution du glycogène hépatique contemporaine de l'hyperglycémie (8, 23, 62) et l'activité phosphatylasique demeure inchangée (24). Par contre la glycogénolyse s'exerce au niveau du muscle cardiaque (68) et du muscle squelettique (8).

Chez la Truite arc-en-ciel soumise à un exercice forcé, NAKANO et TOMLINSON (67) ont constaté une forte augmentation des taux d'adrénaline et de noradrénaline dans le plasma qui s'accompagne d'une hyperglycémie, d'une diminution du taux du glycogène dans le coeur et le muscle squelettique ; le glycogène hépatique étant diminué seulement lorsque le taux initial était élevé. Dans le muscle, l'exercice forcé produit une augmentation de la concentration en AMP cyclique et de la proportion de phosphatylase active.



- Action sur le métabolisme des lipides

Le taux sanguin des acides gras libres est diminué sous l'action de la noradrénaline chez la Carpe, la Brème et la Perche (29, 30) ; le taux du glycérol est inchangé et la diminution des acides gras libres serait consécutive à l'hyperglycémie.

Par contre chez la Lamproie, l'adrénaline provoque une augmentation du taux sanguin des acides gras libres (56, 76) dans les douze heures suivant l'injection.

"In vitro", la lipolyse dans le tissu adipeux n'est pas augmentée (29, 30). FARKAS (32) a d'ailleurs montré que ce phénomène était généralement observé chez les Vertébrés inférieurs. Cet auteur, ayant constaté une inhibition de l'activation de la phosphorylase dans le tissu adipeux chez la Grenouille par le dichloroisoprotérénol, estime qu'il y aurait une augmentation de l'AMP cyclique dans le tissu, et l'absence d'effet lipolytique des catécholamines serait dû à l'absence d'un système lipolytique sensible. Ce fait est confirmé par la non réaction à la théophylline (33). Dans le muscle de Truite l'addition d'adrénaline n'influe pas sur la lipolyse, cependant, quand l'activité lipasique décline après une heure d'incubation, l'adrénaline a un effet activateur (9). Il semble donc que chez les Téléostéens un système lipolytique sensible à l'action de l'adrénaline n'existe pas.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de travaux concernant l'action de l'adrénaline au niveau d'autres composés lipidiques en particulier au niveau du cholestérol.

Enfin, en ce qui concerne l'action des substances adrénolytiques sur les effets métaboliques nous n'avons relevé dans la littérature qu'une seule publication due à FARKAS (31). Cet auteur signale, que chez la Brème, l'inhibition de la lipolyse provoquée par les catécholamines est bloquée par le dichloroisoprotérénol et que d'autre part, l'effet hyperglycémiant est inhibé à la fois par le dichloroisoprotérénol et par l'ergotamine.



## C H A P I T R E   I I

### MATERIEL ET TECHNIQUES D'EXPERIMENTATION

#### 1) - PRODUITS

- Acides aminés, solution standard : AA 5 standard amino acid solution (CALBIOCHEM Ref 893001).
- Acide palmitique pour usages scientifiques (PROLABO).
- L.adrénaline base (NBC) solution stock  $10^{-2}$ M dans HCl 0,02 N.
- "Anticlot" (DELAGRANGE)
- Blut zucker farb test (BOEHRINGER)
- Cholestérol (MERCK)
- Glucose anhydre (PROLABO)
- Phentolamine ("Régistine" CIBA) sous forme d'ampoules dosées à 10 mg/ml.
- Pindolol ("Visken" SANDOZ) sous forme de comprimés.
- Propranolol ("Avlocardyl" AVLON) sous forme de comprimés.
- Résines échangeuses d'ions : Aminex A4 et Aminex A5 (BIORAD).
- Sérum étalon titré protéines ("Labtrol" distribué par BIOLYON.)

#### 2) - ANIMAUX

Les truites arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdnerii* Richardson) d'un poids moyen de 200 grammes ont été livrées directement au Laboratoire par l'Etablissement de pisciculture, par camion citerne pourvu d'une alimentation en oxygène.



Les animaux ont séjourné au Laboratoire dans un bac en matière plastique alimenté en eau courante (température  $12^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ). Chaque lot de livraison comprenait environ quarante truites. Les expériences avaient lieu entre le cinquième et le vingtième jour suivant l'arrivée des animaux. Les truites étaient régulièrement alimentées à l'aide de granulés (Trouvit des Etablissements TROUV-Provins France.)

### 3) - TRAITEMENTS

Les animaux sont anesthésiés par immersion dans un bac contenant du MS 222 (environ 1 gramme pour 10 litres d'eau). (59)

L'adrénaline est injectée par voie intra musculaire dorsale profonde à la dose de 50  $\mu$ g pour 100 grammes de poids d'animal en se basant sur un poids moyen de 200 grammes.

La solution stock d'adrénaline est neutralisée par un volume équivalent de soude 0,02 N et diluée au 1/20 par du chlorure de sodium à 9‰.

Le volume injecté est d'environ 1,2 ml.

Il faut noter l'apparition rapide au point d'injection d'une tache blanche sur la peau de l'animal correspondant à une contraction des mélanophores sous l'action de l'adrénaline.

Lorsque l'on utilise des substances adrénolytiques, elles sont injectées en même temps que l'adrénaline à la dose de 2 mg/100 grammes de poids d'animal.

Les expériences ont été réalisées par séries de quatre animaux qui ont été placés dans un petit bac (capacité quarante litres), alimenté en eau courante, jusqu'au moment des prélèvements.

### 4) - PRELEVEMENTS

Des prélèvements sanguins ont été effectués d'une part chez les animaux témoins n'ayant reçu aucune injection et d'autre part pour les différentes séries d'animaux traités par l'adrénaline (5 heures, 16 heures, 24 heures ou 48 heures après l'injection) et 5 heures après l'injection du mélange adrénaline + inhibiteur.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque après anesthésie de l'animal, en introduisant une aiguille (12/50), imprégnée d'Anticlot, dans la région rétro-operculaire. Le sang est directement recueilli sur Anticlot dans un tube à centrifuger. La centrifugation immédiate permet de recueillir un volume plasmatique de 1 à 2 ml en moyenne.



Nous devons signaler un effet toxique des  $\beta$  bloquants (propranolol, pindolol) qui peut parfois entraîner la mort rapide de l'animal. Dans tous les cas, nous avons constaté que la ponction cardiaque était difficile, ceci correspondant à l'effet dépresseur de ces substances sur le myocarde (coeur dilaté et flasque).

Pour le dosage de l'adrénaline plasmatique le sang est recueilli sur un anticoagulant spécial (E.D.T.A. sel dissodique à 1% neutralisé et additionné de 2% d'hyposulfite de sodium) à raison de 1 volume d'anticoagulant pour 2 volumes de sang. La centrifugation est effectuée dans un tube gradué et on note le volume globulaire de manière à déterminer le terme de dilution plasmatique due à l'addition de l'anticoagulant. Le plasma est immédiatement placé au congélateur en attendant que les dosages soient pratiqués.

Dans les expériences relatives à l'action de l'adrénaline au niveau du métabolisme lipidique, les animaux mâles et femelles ont été étudiés séparément. Le sexe est déterminé après le sacrifice de l'animal par examen direct des gonades selon les critères de BOUGIS (11).

Des prélèvements de foie et de muscle (partie épaxiale du muscle latéral du tronc) ont été également réalisés pour l'étude des acides aminés.

#### 5) - DOSAGE DE L'ADRENALINE PLASMATIQUE

Les dosages ont été effectués dans le Laboratoire de Madame L. PEYRIN selon une technique originale dont les détails techniques sont décrits par PEQUIGNOT (72).

La méthode repose sur le principe suivant :

Le plasma non déprotéinisé est ajusté à un pH déterminé et passé sur colonne d'amberlite IRC 50.

La séparation de l'adrénaline et de la noradrénaline est obtenue par déplacement à l'acétate d'ammonium en deux éluats différents.

Le dosage est effectué par fluorimétrie après oxydation par le ferricyanure de potassium et stabilisation avec le mélange soude-acide ascorbique.

#### 6) - DOSAGE DU GLUCOSE PLASMATIQUE

Nous avons utilisé la technique enzymatique à la glucose oxydase à l'aide des réactifs BOEHRINGER "Blut zucker farb test", en adoptant les conditions techniques suivantes :

- plasma 10 microlitres
- réactif enzymatique 2,5 millilitres.



Incubation pendant 35 minutes à l'obscurité puis addition de 2,5 millilitres d'acide sulfurique à 25 %.

Spectrophotométrie à 535 nanomètres (Spectrophotomètre D.B. Beckman).

Le dosage peut-être réalisé directement sur le plasma, sans déprotéinisation et nous avons vérifié la parfaite spécificité de la technique en comparant les résultats obtenus avec ceux donnés par l'utilisation d'une glucose-oxydase purissime (glucose-oxydase type V Sigma).

L'addition d'acide sulfurique en fin de réaction à l'avantage de produire une coloration stable et plus intense que dans la méthode habituellement utilisée.

#### 7) - DOSAGE DES ACIDES GRAS NON-ESTERIFIES PLASMATIQUES

Nous avons utilisé la technique de ITAYA et UI (49) qui est une modification de la méthode classique de DUNCOMBE (25, 26).

L'extraction des acides gras plasmatiques par le chloroforme (volume de plasma 0,4 ml) est réalisée en présence de tampon phosphate pH 6,5. Dans ces conditions l'extraction est complète. La phase aqueuse contenant les débris protéiques est éliminée par aspiration. La transformation des acides gras en savons de cuivre est réalisée au cours d'une deuxième agitation, puis le réactif au cuivre est éliminé par aspiration et la phase chloroformique est ensuite filtrée pour éliminer toute contamination par le réactif au cuivre.

Sur le filtrat obtenu, la réaction colorée est effectuée directement en ajoutant une goutte de solution de diéthylldithiocarbamate de sodium à 1 %.

On apprécie la densité optique à 440 nanomètres.

La gamme d'étalonnage, obtenue avec des solutions d'acide palmitique, est une droite qui ne passe pas par l'origine.

#### 8) - DOSAGE DU CHOLESTEROL PLASMATIQUE

La technique utilisée est celle décrite par MONNET (63) : extraction par le mélange éthanol-acétate d'éthyle et réaction colorée au perchlorure de fer. L'extraction est effectuée sur 0,2 ml de plasma.



9) - DOSAGE DES PROTEINES PLASMATIQUES

Nous avons utilisé la réaction du biuret selon la technique de GORNALL (84). La réaction est effectuée sur 1 ml de plasma dilué au 1/10. La gamme d'étalonnage est obtenue avec des dilutions d'un sérum étalon titré en protéines (Labtrol).

10) - DOSAGE DES ACIDES AMINES LIBRES PLASMATIQUES ET TISSULAIRES

La technique utilisée est celle de la séparation par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions selon MOORE et STEIN (65).

Par voie automatique, les acides aminés d'un milieu biologique débarrassé au préalable de toutes les substances pouvant interférer, sont fixés sur des résines anioniques et successivement élués par des tampons de pH et de force ionique croissants.

Les acides aminés élués sont colorés par la technique à la ninhydrine et au chlorure stanneux (64) et dosés par spectrophotométrie. Les variations de densité optique sont directement enregistrées.

Préparation des échantillons

Le plasma est déféqué par l'acide trichloracétique à 10 % (dilution au 1/5). Le foie et le muscle sont broyés en présence d'acide trichloracétique à 10 % (dilution 1/10 p : v) dans un homogénéiseur BIOREX refroidi à 0° à 45 000 tours/minute. L'homogénat est centrifugé à + 4° et à 40 000  $\times g$  (Centrifugeuse MSE, HS 18) pendant 15 minutes.

Les extraits trichloracétiques sont introduits dans la chambre d'injection, à l'aide d'une seringue, sous un volume de 0,8 ml, les extraits étant préalablement filtrés (SWINNEX-MILLIPORE : dimensions des pores 0,22 micron).

Appareillage

Nous avons utilisé un auto-analyseur JEOLCO type 5 AH permettant l'analyse simultanée de six échantillons biologiques. L'appareil comprend essentiellement :

- un système d'injection des échantillons permettant leur stockage, directement relié aux colonnes de séparation.
- Deux colonnes thermostatées contenant les résines échangeuses de cations. La colonne 1 permet la séparation des acides aminés basiques ; la colonne 2 permet la séparation des acides aminés acides et neutres.



- Une série de réservoirs contenant les divers tampons d'élu-  
tion (dont le pH doit être exact au 1/100<sup>e</sup>) et la soude  
servant à la régénération des résines. Ces réservoirs sont  
en communication directe avec les réservoirs d'échantillons  
et les colonnes de séparation par des valves d'échanges.
- Un réservoir contenant le réactif à la ninhydrine en com-  
munication avec les sorties de colonne.  
Le réactif à la ninhydrine à la composition suivante :

|                                                            |        |
|------------------------------------------------------------|--------|
| Tampon acétate de sodium 4 M                               | 250 ml |
| Méthyl cellosolve (exempt de peroxydes)                    | 750 ml |
| Ninhydrine                                                 | 20 g   |
| Chlorure stanneux $\text{SnCl}_2$ , 2 $\text{H}_2\text{O}$ | 0,4 g  |

Le méthyl cellosolve sous atmosphère d'azote et la ninhy-  
drine doivent être conservés à + 4° et à l'abri de la lu-  
mière.

- Une série de pompes (pompe des tampons et pompe de détec-  
tion) permettant l'écoulement constant et contrôlé des  
divers réactifs.
- Un bain de réaction dans lequel a lieu le développement  
de la coloration des acides aminés.
- Un spectrophotomètre à double faisceau et à deux longueurs  
d'onde (440 et 570 nanomètres) permettant en continu la  
mesure de la densité optique des effluants du bain de réac-  
tion.
- Un enregistreur permettant l'inscription simultanée des  
variations de densité optique aux deux longueurs d'onde et  
à trois sensibilités différentes.



CONDITIONS DE TRAVAIL

|                          | colonne 1                                               | colonne 2                                             |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Volume échantillon       | 0,8 ml                                                  | 0,8 ml                                                |
| Phase stationnaire       | AMINEX A5                                               | AMINEX A4                                             |
| Phases mobiles           | Tampons citrate<br>pH 4,25 - 0,35 N<br>pH 5,28 - 0,35 N | Tampons citrate<br>pH 3,23 - 0,2 N<br>pH 4,25 - 0,2 N |
| Phase de régénération    | NaOH 0,2N                                               | NaOH 0,2N                                             |
| Dimensions des colonnes  | 0,8 x 15 cm                                             | 0,8 x 70 cm                                           |
| Température des colonnes | 30° - 55°                                               | 30° - 55°                                             |
| Débit des pompes :       |                                                         |                                                       |
| - Tampon                 | 0,83 ml/mn                                              | 0,83 ml/mn                                            |
| - Echantillon            | 0,21 ml/mn                                              | 0,21 ml/mn                                            |
| - Ninhydrine             | 0,42 ml/mn                                              | 0,42 ml/mn                                            |

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| . Temps de réaction        | : 7 minutes      |
| . Température de réaction  | : 100°           |
| . Vitesse d'enregistrement | : 12 cm/heure    |
| . Longueurs d'onde         | : 570 nanomètres |
|                            | : 440 nanomètres |
| . Sensibilités             | : 1 et 3         |



### Exploitation des résultats

La teneur aminés d'un échantillon se détermine par calcul de la surface des pics en la comparant aux surfaces des pics d'une solution standard d'acides aminés.

La concentration de chaque acide aminé présent dans la solution standard CALBIOCHEM est de 2,5 micromoles par millilitre. Cette solution est diluée au 1/20 et injectée sous un volume de 0,8 ml. Ainsi chaque pic correspond à 0,1 micromole d'acide aminé.

Les résultats sont exprimés en milligrammes pour 100 millilitres de plasma, ou pour 100 grammes de poids de tissu à l'état frais.

#### 11) - CALCULS STATISTIQUES

Le principe des méthodes de calcul utilisées à déjà été exposé dans la première partie de notre travail. En ce qui concerne les acides aminés, le grand nombre de résultats obtenus ne nous a pas permis d'utiliser ces méthodes et nous avons analysé les résultats selon les test U de MANN et WHITNEY (91).

Le principe de ce test, simple et rapide, est le suivant :

On effectue la comparaison de chaque observation x et y des deux séries de résultats à analyser. On range toutes les observations des deux séries par valeurs croissantes, soit par exemple :

x x y x y x x y x y y

On considère l'indice  $U_{yx}$  qui est égal à la somme des y qui sont inférieurs à chaque x. Dans notre exemple

$$U_{yx} = 0 + 0 + 1 + 2 + 2 + 3 = 8$$

On fait de même le  $U_{xy}$  et on ne considère que la plus faible des deux valeurs obtenues.

Des tables donnent la limite inférieure du plus petit nombre pour les risques inférieurs à 5 % et inférieurs à 1 % suivant le nombre de résultats des deux séries à comparer.



### C H A P I T R E   I I I

#### RESULTATS

##### 1) - EVOLUTION DU TAUX DE L'ADRENALINE PLASMATIQUE

Chez les animaux témoins, c'est à dire n'ayant subi d'autres manipulations que le transfert le plus rapide possible dans le bac contenant la solution anesthésique, la concentration en adrénaline dans le plasma est de  $16 \pm 1,2$  microgrammes/litre. Cinq heures après l'injection intra-musculaire d'adrénaline à la dose de  $50 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  de poids d'animal, on observe une très forte augmentation du taux de l'adrénaline plasmatique (Tableau VIII). L'adrélinémie diminue ensuite assez rapidement. A u bout de 48 heures le taux est pratiquement revenu à sa valeur initiale ; en effet les cinq essais effectués sur un volume plasmatique de 1,5 ml sont tous au dessous du seuil de sensibilité de la méthode ce qui correspond à une concentration d'adrénaline plasmatique inférieure à 25 microgrammes par litre.

T A B L E A U   V I I I

Variations du taux d'adrénaline plasmatique en fonction du temps suivant l'injection d'adrénaline à la dose de  $50 \mu\text{g}$  pour 100 grammes de poids d'animal.

Les valeurs sont exprimées en microgrammes/litre.

| TRAITEMENT      | Nombre de<br>Mesures ° | ADRENALINEMIE<br>$\bar{x} \pm \text{sm}$ |
|-----------------|------------------------|------------------------------------------|
| TEMOINS         | 4 (16)                 | $16 \pm 1,2$                             |
| ADRENALINE 5 h  | 5 (5)                  | $243 \pm 13$                             |
| ADRENALINE 16 h | 5 (5)                  | $70 \pm 16$                              |
| ADRENALINE 48 h | 5 (5)                  | < 25                                     |

° le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses.



## 2) - ACTION DE L'ADRENALINE SUR LA GLYCEMIE

Les résultats obtenus pour les divers temps suivant l'injection d'adrénaline, sont représentés dans le tableau IX et l'analyse statistique dans le tableau XI.

Cinq heures après l'injection d'adrénaline on observe une forte hyperglycémie qui se maintient à la 16<sup>ème</sup> heure. La glycémie décroît ensuite progressivement, cependant au bout de 48 heures elle reste supérieure à celle des animaux témoins.

L'effet des substances adrénolytiques, administrées en même temps que l'adrénaline, a été étudié 5 heures après l'injection. Les résultats figurent dans le tableau X et l'analyse statistique dans le tableau XI.

On voit que la phentolamine se révèle sans aucun effet sur l'hyperglycémie adrénalinique. En revanche, les inhibiteurs  $\beta$ , propranolol et pindolol, provoquent une forte inhibition de l'action de l'adrénaline. Les taux observés restent cependant supérieurs au taux de glycémie des animaux témoins.

L'expérience réalisée avec le pindolol seul montre un effet hyperglycémiant propre de cette substance.



T A B L E A U I X

Variations de la glycémie en fonction du temps suivant l'injection d'adrénaline à la dose de 50 µg pour 100 grammes de poids d'animal.

Les valeurs sont exprimées en grammes / litre.

| Traitement      | nombre<br>d'animaux | Glycémie<br>$\bar{x} \pm sm$ |
|-----------------|---------------------|------------------------------|
| Témoins         | 18                  | 0,76 $\pm$ 0,02              |
| Adrénaline 5 h  | 14                  | 2,40 $\pm$ 0,06              |
| Adrénaline 16 h | 11                  | 2,57 $\pm$ 0,15              |
| Adrénaline 24 h | 10                  | 1,69 $\pm$ 0,18              |
| Adrénaline 48 h | 10                  | 0,96 $\pm$ 0,05              |



T A B L E A U X

Effets des substances adrénolytiques sur l'hyperglycémie provoquée par l'adrénaline 5 heures après l'injection.

Les valeurs sont exprimées en grammes / litre.

| Traitement                      | Nombre<br>d'animaux | Glycémie<br>$\bar{x} \pm sm$ |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Témoins                         | 18                  | $0,76 \pm 0,02$              |
| Adrénaline 5 h                  | 14                  | $2,40 \pm 0,06$              |
| Adrénaline<br>+<br>Phentolamine | 14                  | $2,35 \pm 0,10$              |
| Adrénaline<br>+<br>Propranolol  | 12                  | $1,31 \pm 0,08$              |
| Adrénaline<br>+<br>Pindolol     | 12                  | $1,23 \pm 0,08$              |
| Pindolol seul                   | 8                   | $1,26 \pm 0,09$              |



T A B L E A U X I

Etude statistique par analyse de variance de la glycémie aux différents temps suivant l'injection d'adrénaline et en présence de substances adrénolytiques.

| MOYENNES PRISES DEUX A DEUX                | F     | S°  |
|--------------------------------------------|-------|-----|
| TEMOINS/ADRENALINE 5h                      | 685   | +++ |
| ADRENALINE 5h/ADRENALINE 16 h              | 1,32  | -   |
| ADRENALINE 16 h / ADRENALINE 24 h          | 13,46 | ++  |
| ADRENALINE 24 h / ADRENALINE 48 h          | 14,05 | ++  |
| TEMOINS / ADRENALINE 48 h                  | 16,84 | +++ |
| ADRENALINE 5 h / ADRENALINE + PHENTOLAMINE | 0,14  | -   |
| ADRENALINE 5 h / ADRENALINE + PROPRANOLOL  | 133,5 | +++ |
| TEMOINS / ADRENALINE + PROPRANOLOL         | 123,8 | +++ |
| ADRENALINE 5 h / ADRENALINE + PINDOLOL     | 80,0  | +++ |
| TEMOINS / ADRENALINE + PINDOLOL            | 41,3  | +++ |
| TEMOINS / PINDOLOL SEUL                    | 46,1  | +++ |
| ADRENALINE + PINDOLOL / PINDOLOL SEUL      | 0,03  | -   |

o signification :  $p < 0,001 = +++$  ;  $p < 0,01 = ++$  ;  $p > 0,05 = -$



3) - ACTION DE L'ADRENALINE SUR LE TAUX DES ACIDES GRAS LIBRES PLASMA-  
TIQUES

Les résultats rassemblés dans le tableau XII montrent que l'adrénaline ne modifie pas le taux des acides gras libres plasmatiques chez la Truite.

Il faut noter que les variations individuelles sont très importantes et qu'il aurait été souhaitable de pouvoir comparer chez un même animal les taux d'acides gras libres avant et après injection d'adrénaline ; mais cette façon de procéder était irréalisable en raison de la nature de l'animal d'expérience.

4) - ACTION DE L'ADRENALINE SUR LE TAUX DU CHOLESTEROL PLASMATIQUE

Les résultats d'ensemble figurent dans le tableau XIII et l'analyse statistique dans le tableau XIV.

On constate, pour les deux sexes, une augmentation significative de la cholestérolémie 5 heures après l'injection d'adrénaline qui se maintient à la 16 ème heure.

Au bout de 48 heures, la cholestérolémie est revenue à son taux initial.



T A B L E A U X I I

Etude de la teneur en acides gras libres plasmatiques en fonction du temps suivant l'injection d'adrénaline à la dose de 50 µg pour 100 grammes de poids d'animal.

Les valeurs sont exprimées en micromoles/litre.

| TRAITEMENT      | ANIMAUX MALES                       | ANIMAUX FEMELLES                    |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                 | Acides gras libres $\bar{x} \pm sm$ | Acides gras libres $\bar{x} \pm sm$ |
| TEMOINS         | 997 $\pm$ 104<br>(17)               | 844 $\pm$ 57<br>(19)                |
| ADRENALINE 5 h  | 1035 $\pm$ 102<br>(15)              | 936 $\pm$ 82<br>(18)                |
| ADRENALINE 16 h | 995 $\pm$ 72<br>(14)                | 876 $\pm$ 85<br>(12)                |
| ADRENALINE 48 h | 863 $\pm$ 78<br>(13)                | 862 $\pm$ 104<br>(12)               |

Le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses



T A B L E A U   X I I I

Variations de la cholestérolémie en fonction du temps suivant l'injection d'adrénaline à la dose de 50 µg pour 100 grammes de poids d'animal.

Les valeurs sont exprimées en grammes/litre.

| TRAITEMENT     | ANIMAUX MALES<br>Cholestérolémie $\bar{x} \pm sm$ | ANIMAUX FEMELLES<br>Cholestérolémie $\bar{x} \pm sm$ |
|----------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| TEMOINS        | 2,80 $\pm$ 0,13<br>(22)                           | 2,98 $\pm$ 0,12<br>(25)                              |
| ADRENALINE 5h  | 3,94 $\pm$ 0,15<br>(21)                           | 3,66 $\pm$ 0,12<br>(23)                              |
| ADRENALINE 16h | 3,58 $\pm$ 0,13<br>(19)                           | 3,42 $\pm$ 0,16<br>(20)                              |
| ADRENALINE 48h | 2,94 $\pm$ 0,17<br>(16)                           | 2,98 $\pm$ 0,15<br>(16)                              |

Le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses



T A B L E A U X I V

Etude statistique par analyse de variance de la cholestérolémie aux différents temps suivant l'injection d'adrénaline à la dose de 50µg/100g de poids d'animal.

(en haut à droite : animaux mâles, en bas à gauche, animaux femelles, les valeurs de la grande diagonale correspondent à la comparaison entre les animaux mâles et femelles).

|                     | TEMOINS          | ADRENALINE<br>5h | ADRENALINE<br>16h | ADRENALINE<br>48h | ANIMAUX<br>MALES  |
|---------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| TEMOINS             | F = 0,97<br>-    | F = 30,92<br>+++ | F = 15,94<br>+++  | F = 0,41<br>-     | TEMOINS           |
| ADRENALINE<br>5h    | F = 15,88<br>+++ | F = 1,99<br>-    | F = 2,85<br>-     | F = 18,87<br>+++  | ADRENALINE<br>5h  |
| ADRENALINE<br>16h   | F = 4,85<br>+    | F = 1,59<br>-    | F = 0,61<br>-     | F = 8,72<br>++    | ADRENALINE<br>16h |
| ADRENALINE<br>48h   | F = 0<br>-       | F = 12,52<br>++  | F = 3,69<br>±     | F = 0,03<br>-     | ADRENALINE<br>48h |
| ANIMAUX<br>FEMELLES | TEMOINS          | ADRENALINE<br>5h | ADRENALINE<br>16h | ADRENALINE<br>48h |                   |

Signification : P < 0,001 = +++  
P > 0,05 = -

P < 0,01 = ++  
P < 0,07 = ±

P < 0,05 = +



Le simple examen des valeurs moyennes, semblerait indiquer une réactivité plus importante des animaux mâles. En effet, l'augmentation relative de la cholestérolémie après 5 heures est de 40 % pour les mâles et seulement de 23 % pour les femelles, cependant la comparaison directe des résultats par analyse de variance ne permet pas de confirmer cette impression. Nous reviendrons sur ce point lors de l'interprétation des résultats.

Les résultats des expériences réalisées en présence de substances adréno-lytiques sont rassemblés dans le tableau XV et l'analyse statistique dans le tableau XVI.

On voit qu'en présence de phentolamine l'action hypercholestérolémiant de l'adrénaline est totalement inhibée. Par contre, le propranolol et le pindolol se révèlent sans aucun effet.



T A B L E A U X V

Effets des substances adrénolytiques sur l'hypercholestérolémie provoquée par l'adrénaline 5 heures après l'injection.

Les valeurs sont exprimées en grammes/litre.

| TRAITEMENT                         | ANIMAUX MALES<br>cholestérolémie $\bar{x} \pm sm$ | ANIMAUX FEMELLES<br>cholestérolémie $\bar{x} \pm sm$ |
|------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| TEMOINS                            | $2,80 \pm 0,13$<br>(22)                           | $2,98 \pm 0,12$<br>(25)                              |
| ADRENALINE 5h                      | $3,94 \pm 0,15$<br>(21)                           | $3,66 \pm 0,12$<br>(23)                              |
| ADRENALINE 5h<br>+<br>PHENTOLAMINE | $2,83 \pm 0,17$<br>(12)                           | $2,86 \pm 0,16$<br>(14)                              |
| ADRENALINE 5h<br>+<br>PROPRANOLOL  | $4,00 \pm 0,16$<br>(11)                           | $3,78 \pm 0,17$<br>(10)                              |
| ADRENALINE 5h<br>+<br>PINDOLOL     | $3,82 \pm 0,11$<br>(12)                           | $3,68 \pm 0,14$<br>(11)                              |

Le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses.



T A B L E A U X V I

Analyse statistique par analyse de variance des valeurs de la cholestérolémie après administration d'adrénaline et en présence des substances adrénolytiques.

| ANIMAUX MALES                    | TEMOINS          | ADRENALINE 5 h   |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| ADRENALINE 5 h<br>+ PHENTOLAMINE | F = 0,01<br>-    | F = 21,63<br>+++ |
| ADRENALINE 5 h<br>+ PROPRANOLOL  | F = 28,56<br>+++ | F = 0,06<br>-    |
| ADRENALINE 5 h<br>+ PINDOLOL     | F = 25,36<br>+++ | F = 0,25<br>-    |
| ANIMAUX FEMELLES                 | TEMOINS          | ADRENALINE 5 h   |
| ADRENALINE 5 h<br>+ PHENTOLAMINE | F = 0,34<br>-    | F = 16,26<br>+++ |
| ADRENALINE 5 h<br>+ PROPRANOLOL  | F = 12,93<br>++  | F = 0,27<br>-    |
| ADRENALINE 5 h<br>+ PINDOLOL     | F = 11,28<br>++  | F = 0,003<br>-   |

Signification :  $P < 0,001 = +++$  ;  $P < 0,01 = ++$  ;  $P > 0,05 = -$



5) - ACTION DE L'ADRENALINE SUR LE TAUX DES PROTEINES PLASMATIQUES

Les résultats figurant dans le tableau XVII montrent que l'administration d'adrénaline ne modifie pas le taux des protéines plasmatiques.

T A B L E A U   X V I I

Effet de l'adrénaline sur le taux des protéines plasmatiques. Les valeurs sont exprimées en grammes/litre.

| TRAITEMENT      | ANIMAUX MALES<br>Protéïnémie $\bar{x} \pm sm$ | ANIMAUX FEMELLES<br>Protéïnémie $\bar{x} \pm sm$ |
|-----------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| TEMOINS         | $34,2 \pm 0,9$<br>(12)                        | $34,1 \pm 1,0$<br>(12)                           |
| ADRENALINE 5 h  | $35,0 \pm 1,0$<br>(9)                         | $34,3 \pm 0,9$<br>(10)                           |
| ADRENALINE 16 h | $34,9 \pm 1,0$<br>(8)                         | $35,1 \pm 1,0$<br>(8)                            |
| ADRENALINE 48 h | $33,2 \pm 0,9$<br>(9)                         | $34,2 \pm 1,0$<br>(8)                            |

Le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses



6) - ACTION DE L'ADRENALINE SUR LE TAUX DES ACIDES AMINES LIBRES PLASMA-  
TIQUES ET TISSULAIRES

Les résultats et l'analyse statistique sont représentés dans les tableaux XVIII (plasma), XIX (foie), et XX (muscle squelettique). Pour ces expériences six animaux témoins et six animaux soumis à l'action de l'adrénaline ont été utilisés.

Les acides aminés sont mentionnés suivant leur ordre d'élution. Certains composés (acides aminés ou substances ninhydrine positives) ne figurent pas dans les tableaux bien que leur détection soit possible. C'est le cas de la cystine, homocystine, hydroxyproline,  $\beta$  alanine, de l'ornithine, de la citrulline, de la phosphosérine, phosphoéthanolamine, et de la glycérophosphoéthanolamine, de la cystathionine et glucosamine, des acides  $\alpha$  amino butyrique,  $\beta$  amino iso butyrique,  $\gamma$  amino butyrique,  $\alpha$  aminoadipique, de la dioxyphényl alanine, et de la sarcosine. Aux dilutions utilisées, ces produits sont présents de manière inconstante et seulement à l'état de traces chez les animaux témoins et chez les animaux traités.

Ne figurent pas également :

- L'acide aspartique, présent à l'état de traces dans le plasma, il se trouve en quantité importante dans les tissus mais une mauvaise séparation ne permet pas d'évaluation valable.
- la taurine dont le taux ne peut pas être évalué dans le foie en raison d'une trop forte concentration.
- la 3 méthyl-histidine, présente seulement dans le muscle.

Nous avons étudié l'effet de l'adrénaline 5 heures après l'injection.

Vu les faibles variations observées, il ne nous a pas semblé utile de poursuivre cette expérimentation avec des temps d'action plus longs.



T A B L E A U X V I I I

Effet de l'adrénaline sur le taux des acides aminés libres plasmatiques. Etude statistique.

Les valeurs sont exprimées en milligrammes pour 100 millilitres.

| ACIDES AMINES    | MOYENNE<br>TEMOINS | MOYENNE<br>TRAITES | TEST U ° |
|------------------|--------------------|--------------------|----------|
| LYSINE           | 6,53               | 5,00               | 0        |
| HISTIDINE        | 1,94               | 1,63               | 0        |
| ARGININE         | 3,69               | 1,96               | -        |
| TAURINE          | 14,59              | 20,09              | 0        |
| THREONINE        | 3,67               | 2,36               | -        |
| SERINE           | 2,68               | 1,40               | -        |
| PROLINE          | 2,27               | 0,77               | --       |
| ACIDE GLUTAMIQUE | 1,23               | 1,05               | 0        |
| GLYCINE          | 4,46               | 3,16               | 0        |
| ALANINE          | 3,97               | 3,50               | 0        |
| VALINE           | 7,88               | 6,93               | 0        |
| METHIONINE       | 2,46               | 1,55               | 0        |
| ISO-LEUCINE      | 2,92               | 2,70               | 0        |
| LEUCINE          | 6,41               | 5,39               | 0        |
| TYROSINE         | 1,10               | 1,10               | 0        |
| PHENYL ALANINE   | 2,47               | 1,68               | -        |

- ° 0 = pas de variation significative
- = diminution significative  $P < 0,05$
- = diminution significative  $P < 0,01$



T A B L E A U X I X

Effet de l'adrénaline sur le taux des acides aminés libres hépatiques - Etude statistique.

Les valeurs sont exprimées en milligrammes pour 100 grammes de poids de tissu à l'état frais.

| ACIDES AMINES    | MOYENNE<br>TEMOINS | MOYENNE<br>TRAITES | TEST U ° |
|------------------|--------------------|--------------------|----------|
| LYSINE           | 7,63               | 13,53              | 0        |
| HISTIDINE        | 12,65              | 8,85               | 0        |
| ARGININE         | 1,68               | 5,72               | +        |
| THREONINE        | 10,00              | 14,46              | 0        |
| SERINE           | 12,65              | 8,78               | 0        |
| PROLINE          | 9,37               | 13,37              | 0        |
| ACIDE GLUTAMIQUE | 128,87             | 81,02              | 0        |
| GLYCINE          | 13,84              | 11,80              | 0        |
| ALANINE          | 35,20              | 26,59              | 0        |
| VALINE           | 5,23               | 9,52               | +        |
| METHIONINE       | 1,02               | 0,95               | 0        |
| ISO-LEUCINE      | 2,74               | 5,23               | ++       |
| LEUCINE          | 5,75               | 9,04               | +        |
| TYROSINE         | 0,95               | 2,42               | 0        |
| PHENYL ALANINE   | 1,66               | 3,37               | 0        |

° Signification : 0 = pas de variation significative

+ = augmentation significative  $P < 0,05$

++ = augmentation significative  $P < 0,01$



T A B L E A U X X

Effet de l'adrénaline sur le taux des acides aminés libres musculaires.  
Etude statistique.

Les valeurs sont exprimées en milligramme pour 100 grammes de poids de tissu à l'état frais.

| ACIDES AMINES      | MOYENNE TEMOINS | MOYENNE TRAITES | TEST U° |
|--------------------|-----------------|-----------------|---------|
| LYSINE             | 9,07            | 15,44           | 0       |
| HISTIDINE          | 66,38           | 75,83           | 0       |
| 3 METHYL HISTIDINE | 159,59          | 165,65          | 0       |
| ARGININE           | 1,32            | 2,50            | 0       |
| TAURINE            | 64,14           | 49,98           | 0       |
| THREONINE          | 9,62            | 8 99.           | 0       |
| SERINE             | 12,41           | 10,64           | 0       |
| PROLINE            | 9,08            | 6,42            | 0       |
| ACIDE GLUTAMIQUE   | 7,95            | 5,46            | 0       |
| GLYCINE            | 90,67           | 90,28           | 0       |
| ALANINE            | 27,60           | 21,13           | 0       |
| VALINE             | 5,18            | 5,00            | 0       |
| METHIONINE         | 2,19            | 2,35            | 0       |
| ISO-LEUCINE        | 1,93            | 2,23            | 0       |
| LEUCINE            | 4,34            | 4,40            | 0       |
| TYROSINE           | 0,66            | 0,93            | 0       |
| PHENYL ALANINE     | 1,18            | 1,81            | 0       |

0 = pas de variation significative.



Les résultats ont été analysé selon le test U. Dans les tableaux ne figurent que la moyenne arithmétique et les résultats de l'analyse statistique.

Dans le plasma, on constate, sous l'action de l'adrénaline, une diminution significative des taux d'arginine, thréonine, sérine, proline et phényl alanine.

Dans le foie, on observe une augmentation significative des taux de l'arginine, valine, leucine, et iso-leucine.

Au niveau du muscle, l'administration d'adrénaline ne provoque aucune modification du taux des acides aminés libres.



## C H A P I T R E   I V

### INTERPRETATION DES RESULTATS

#### 1) - CHOIX DE LA DOSE D'ADRENALINE ADMINISTREE ET EVOLUTION DE L'ADRENALINE PLASMATIQUE

Le taux d'adrénaline plasmatique, chez les animaux témoins, est dans notre expérimentation sensiblement plus élevé que celui constaté par d'autres auteurs (67). Cette différence est certainement due au fait que les méthodes de dosage ne sont pas les mêmes. La technique que nous avons utilisée est caractérisée par une excellente extraction et une spécificité totale.

Nous rappelons que les animaux témoins n'ont subi aucune manipulation. Certains auteurs utilisent comme témoins des animaux ayant reçu une injection de chlorure de sodium isotonique. Une telle pratique ne nous a pas semblé souhaitable. En effet, une injection intra musculaire à un poisson entraine nécessairement un stress qui se traduit par la libération de catécholamines ; il est donc difficile de considérer un tel animal comme un animal témoin. Il nous a semblé préférable d'utiliser comme témoin des animaux ayant subi le minimum de manipulation car, notre but était d'étudier les effets de l'adrénaline de façon globale et non pas de relier très précisément les résultats observés à la dose reçue. Nous avons administré une dose massive permettant de considérer comme négligeable la libération de catécholamines endogènes. Cinq heures après l'injection d'adrénaline à la dose de 50  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de poids d'animal nous pouvons constater que l'adrénaline a déjà été l'objet soit d'une fixation tissulaire, soit d'une métabolisation puisque le taux plasmatique n'est que de 243  $\mu\text{g}/\text{litre}$  (voir tableau VIII). L'élévation de l'adrénalinémie s'estompe rapidement : elle n'est plus que de 70  $\mu\text{g}/\text{l}$  au bout de 16 heures et elle a retrouvé sa valeur initiale au bout de 48 heures.

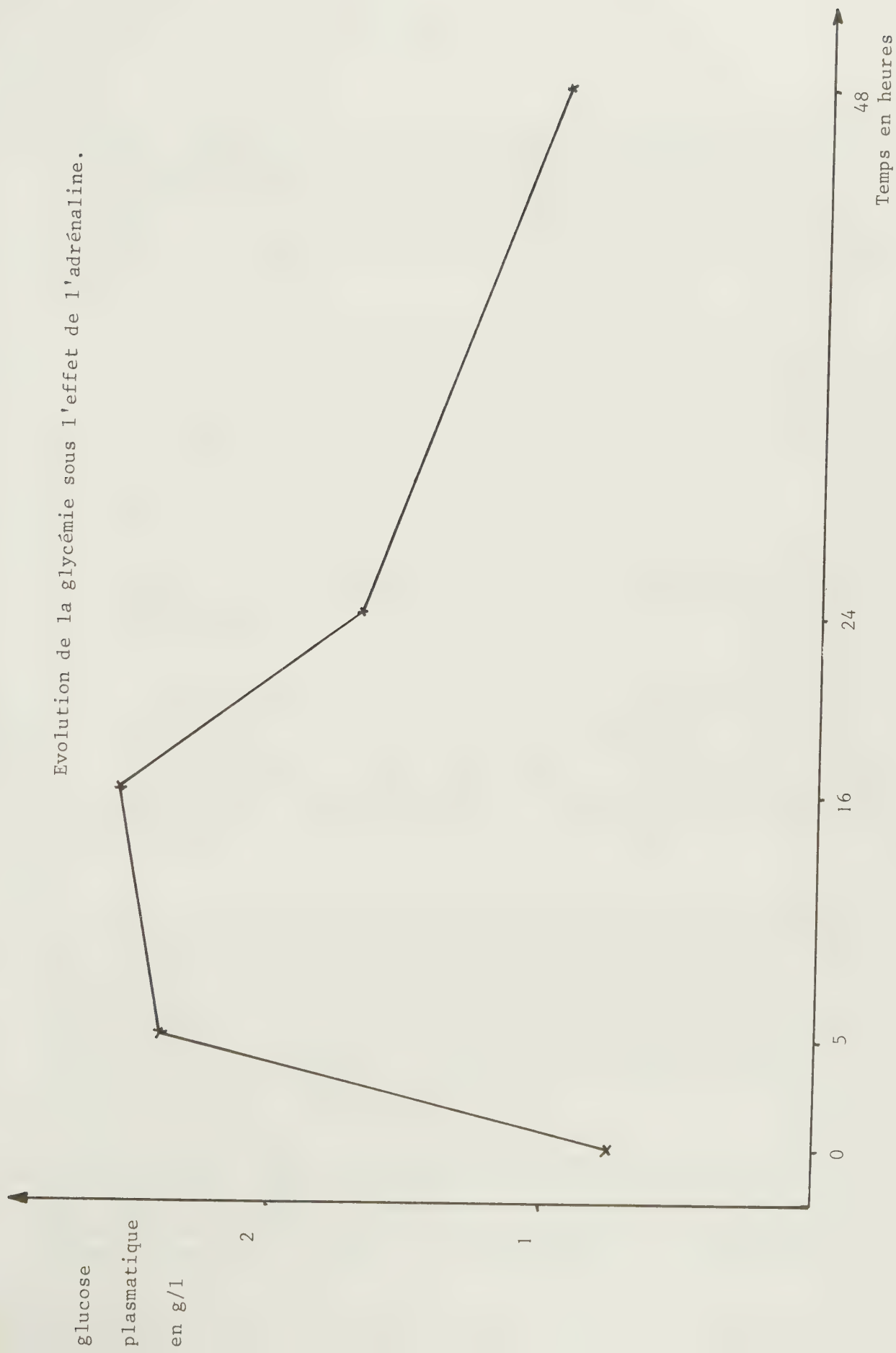
#### 2) - ACTION DE L'ADRENALINE AU NIVEAU DU METABOLISME GLUCIDIQUE

L'évolution de la glycémie en fonction du temps est représentée sur la figure 4. On retrouve chez la Truite l'effet hyperglycémiant général de l'adrénaline. Il faut noter une décroissance très lente de cette hyperglycémie, ce phénomène étant d'ailleurs habituel chez les Poissons. Cependant nous n'avons pas retrouvé le caractère biphasique signalé dans certains cas (62, 74) ; ceci provient peut être du nombre limité de prélèvements au cours du temps.



FIGURE 4

Evolution de la glycémie sous l'effet de l'adrénaline.





En ce qui concerne le mécanisme de l'action hyperglycémiant de l'adrénaline, les expériences que nous avons réalisées, jointes aux données de la littérature, nous permettent de penser que chez les Poissons, le processus est beaucoup plus simple que chez les Mammifères. En effet, plusieurs facteurs impliqués dans l'action hyperglycémiant des catécholamines chez les Mammifères ne semblent pas jouer de rôle chez les Poissons :

- l'administration d'adrénaline n'entraîne pas d'inhibition de la sécrétion d'insuline (24) : Chez les Mammifères, cette inhibition s'exerce par la voie de récepteurs  $\alpha$  (78). Chez la Truite, nous avons constaté que la phentolamine ne cause aucune inhibition de l'hyperglycémie (voir tableau X) ; ceci semble donc confirmer l'absence d'action directe de l'adrénaline au niveau du pancréas.
- l'adrénaline ne semble pas entraîner de modification de la concentration du glycogène hépatique (8, 24).
- l'adrénaline n'augmente pas la libération des acides gras libres comme nous l'avons observé, (voir tableau XII) en accord avec les constatations faites par FARKAS (29, 30) chez d'autres espèces de poissons.
- l'adrénaline ne semble pas induire une importante gluconéogenèse à partir des acides aminés (voir tableaux XVIII, XIX, XX). Nous avons constaté une diminution du taux plasmatique de certains amino-acides glucoformateurs (arginine, thréonine, sérine et proline), cependant ces variations mineures et concernant des acides aminés présents en faible quantité, indiquent que la gluconéogenèse à partir des acides aminés n'a qu'un rôle très limité, voire négligeable, dans l'hyperglycémie adrénalinique.

On peut penser que l'action hyperglycémiant se fait essentiellement par l'intermédiaire de la glycogénolyse musculaire, en effet, la diminution du taux de glycogène dans le muscle a déjà été signalée (8, 67). D'autre part, l'effet inhibiteur des  $\beta$  bloquants que nous avons constaté, (voir tableau X) permet de penser que l'action de l'adrénaline se réalise par l'intermédiaire de l'adényl-cyclase. Nous pensons que l'hyperlactacidémie consécutive à la glycogénolyse musculaire entraînerait une augmentation de la gluconéogenèse au niveau du foie qui produirait l'hyperglycémie. Ce fait reste encore à prouver et fera nous l'espérons l'objet de recherches personnelles à venir.

La gluconéogenèse hépatique consécutive à l'hyperlactacidémie, permettrait d'expliquer l'effet hyperglycémiant propre des substances  $\beta$  lytiques signalé par d'autres auteurs chez les Mammifères (44), et particulièrement important dans nos expériences personnelles. L'administration de ces substances s'accompagne d'un effet dépresseur très marqué sur le



myocarde, qui entraîne certainement un défaut d'oxygénation tissulaire et par conséquent une hyperproduction d'acide lactique.

### 3) - ACTION DE L'ADRENALINE AU NIVEAU DU METABOLISME LIPIDIQUE

L'administration d'adrénaline chez la Truite ne modifie pas la concentration des acides gras libres plasmatiques. (voir tableau XII). Nous n'avons pas retrouvé la diminution d'acides gras libres signalée par FARKAS (29, 30) avec la noradrénaline. L'absence d'effet lipolytique des catécholamines semble être une particularité dans la réactivité pharmacologique des Poissons (30), et d'une façon plus générale des animaux à sang froid (32). Cependant, il est intéressant de rappeler une observation contradictoire faite par PLISETSKAYA et MAZINA (76). Ces auteurs ont constaté une augmentation du taux sanguin des acides gras libres après l'administration d'adrénaline chez des lamproies maintenues dans des eaux froides (5 à 8°). On peut émettre l'hypothèse que l'effet lipolytique, en relation directe avec l'action calorigène des catécholamines, ne se manifeste pas chez les Poïkilothermes dans les conditions normales ; cependant, dans des conditions ambiantes défavorables (ce qui est le cas des expériences de PLISETSKAYA et MAZINA), un tel effet pourrait se manifester. On ne peut donc pas formellement conclure à l'absence d'un système lipolytique sensible à l'action des catécholamines chez les Poissons. Il serait sans doute intéressant de compléter notre étude chez la Truite par des expériences réalisées sur des animaux maintenus dans une eau de basse température.

Comme chez les Mammifères l'adrénaline produit chez la Truite une hypercholestérolémie (voir tableau XIII). La variation est relativement faible (augmentation relative maximum de 40 % chez les mâles au bout de 5 heures), et le taux du cholestérol revient à sa valeur initiale au bout de 48 heures.

L'augmentation du cholestérol plasmatique résulte bien d'une augmentation de la libération de lipoprotéines. En effet, le taux des protéines totales demeure inchangé : il n'y a donc pas de variation de la teneur hydrique du plasma. (voir tableau XVII).

Bien que le mécanisme exact de l'hypercholestérolémie adrénalinique ne soit pas éclairci, il était admis par certains auteurs que, chez les Mammifères, l'hypercholestérolémie était consécutive à l'augmentation de la libération des acides gras libres (94). Les expériences que nous avons réalisées chez la Truite montrent, au contraire, qu'il n'y a pas de relation entre ces deux effets de l'adrénaline puisque l'on observe une hypercholestérolémie en l'absence d'action lipolytique. Ceci confirme les constatations faites par BARRETT (7) chez le Chien. Pour cet auteur, l'hypercholestérolémie ne résulte pas de la libération d'acides gras mais est consécutive à l'hypersecrétion d'ACTH.



Il convient également de signaler l'augmentation observée dans le foie des taux de leucine et iso-leucine (voir tableau XIX). On sait que la leucine peut rejoindre les intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol, en étant transformée en acide  $\beta$  hydroxy  $\beta$  méthyl glutarique qui donne naissance à l'acide mévalonique (77).

Chez la Truite l'effet hypercholestérolémiant de l'adrénaline se réalise par l'intermédiaire de récepteurs de type  $\alpha$ , puisque la phentolamine provoque une inhibition totale alors que le propranolol et le pindolol n'ont aucune influence (voir tableau XV).

La seule expérience de ce type réalisée chez les Mammifères (81) a montré, chez la Souris, que l'hypercholestérolémie est inhibée à la fois par la phentolamine et le propranolol.

La comparaison des résultats obtenus chez les animaux mâles, et femelles, semble indiquer une différence de réactivité suivant le sexe ; la courbe représentant l'augmentation relative du taux du cholestérol en fonction du temps (figure 5) semble assez démonstrative à cet égard. Cependant les comparaisons directes des différents groupes d'observations ne permettent pas de mettre en évidence une variation statistiquement significative que ce soit pour les animaux témoins ou pour les animaux soumis à l'action de l'adrénaline pendant 5 heures et 16 heures (voir tableau XIV).

Pour donner une signification mathématique à l'impression subjective que nous avons d'une différence de réactivité entre les animaux mâles et femelles, nous avons rassemblé pour chaque sexe toutes les valeurs obtenues pour les animaux présentant une hypercholestérolémie, et soumises deux groupes à l'analyse de variance. Chaque groupe est donc constitué par le rassemblement des observations suivantes :

- Animaux traités par l'adrénaline seule pendant 5 h
- Animaux traités par l'adrénaline seule pendant 16 h
- Animaux traités par l'adrénaline en présence de propranolol
- Animaux traités par l'adrénaline en présence de pindolol

On peut considérer que ces groupes d'observations sont homogènes, puisqu'ils sont constitués par des sous-groupes ne différant pas significativement entre eux mais significativement différents des témoins.

Par cet artifice, nous augmentons évidemment le nombre d'observations et l'analyse de variance (tableau XXI) permet de mettre en évidence une augmentation du taux de cholestérol significativement plus élevé chez les animaux mâles que chez les animaux femelles.



FIGURE 5

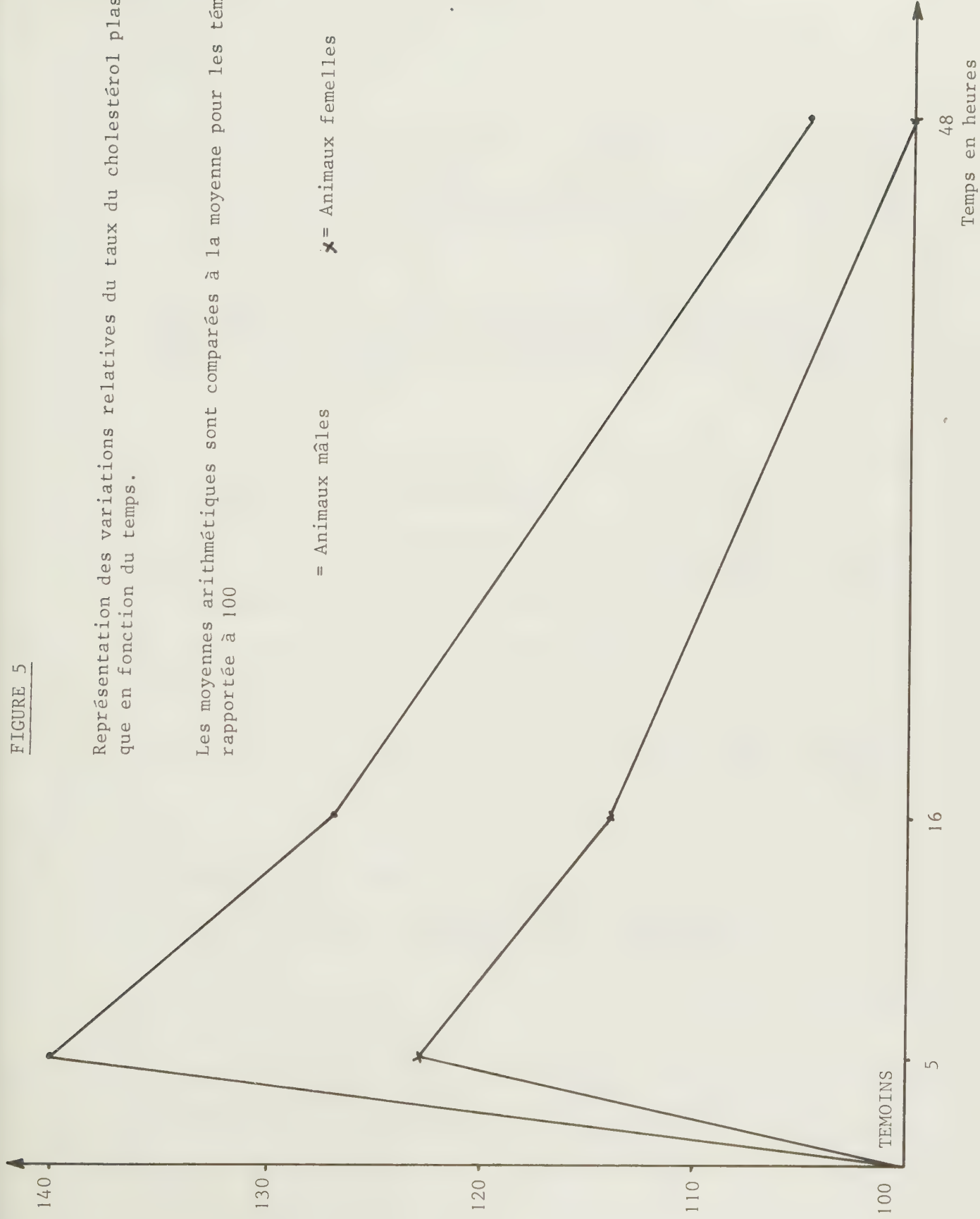
Représentation des variations relatives du taux du cholestérol plasmatique en fonction du temps.

Les moyennes arithmétiques sont comparées à la moyenne pour les témoins rapportée à 100

= Animaux mâles

✕ = Animaux femelles

- 88 -





T A B L E A U   X X I

Comparaison des taux du cholestérol plasmatique chez les animaux mâles et femelles présentant une hypercholestérolémie après administration d'adrénaline.

| ANIMAUX       | CHOLESTEROLEMIE<br>$\bar{x} \pm sm$ | F      | S° |
|---------------|-------------------------------------|--------|----|
| MALES (63)    | 3,82 $\pm$ 0,07                     | } 3,94 | +  |
| FEMELLES (64) | 3,61 $\pm$ 0,07                     |        |    |

° Signification  $P < 0,05 = +$

Le nombre d'animaux utilisés figure entre parenthèses.



Il est intéressant de rapprocher cette constatation d'un travail de HETTIARATCHI et PICKFORD (45) montrant dans un domaine très différent (étude des mouvements ioniques chez le Chien) une moindre réactivité des animaux femelles. Ces auteurs pensent que ce phénomène serait dû à une interférence des substances oestrogènes au niveau des récepteurs  $\alpha$ . Dans le cas de l'hypercholestérolémie chez la Truite, l'effet s'exerce bien par l'intermédiaire de récepteurs  $\alpha$  et la différence de réactivité peu importante, pourrait s'expliquer par une faible imprégnation oestrogénique chez la Truite, si l'on veut tenir compte du caractère particulier de l'activité sexuelle chez les Poissons. Nous pensons cependant que cette différence de réactivité suivant le sexe est un aspect très intéressant de l'action de l'adrénaline. Dans ce domaine, des études approfondies chez les Mammifères sont d'ores et déjà entreprises dans le Laboratoire.

#### 4) - ACTION DE L'ADRENALINE AU NIVEAU DU METABOLISME PROTIDIQUE

Dans le domaine des composés protidiques, les recherches volontairement limitées n'ont eu pour but que d'essayer d'apporter des éléments complémentaires d'interprétation en rapport avec les modifications observées au niveau des métabolismes glucidique et lipidique.

L'action de l'adrénaline n'a été envisagée qu'en ce qui concerne les variations éventuelles des protéines plasmatiques totales et des acides aminés libres plasmatiques, hépatiques et musculaires.

Le dosage des protéines plasmatiques nous a montré qu'il n'y avait pas de variation du taux global de ces composés sous l'action de l'adrénaline (voir tableau XVII) ; cependant l'augmentation du taux de cholestérol est certainement le témoin d'une modification de la sécrétion de lipoprotéines.

L'étude des acides aminés libres plasmatiques et tissulaires ne montre que des modifications mineures (voir tableaux XVIII, XIX et XX) :

- diminution des taux plasmatiques de l'arginine, thréonine, sérine, proline et phényl-alanine.
- augmentation des taux hépatiques de l'arginine, valine, leucine, et iso-leucine.

Les modifications des taux plasmatiques d'arginine, thréonine, sérine et proline sont peut être à mettre en relation avec un gluconéogénèse concourant pour une faible part à l'effet hyperglycémiant.



Les modifications des taux hépatiques de leucine et iso-leucine sont à mettre en relation avec les mécanismes de la biosynthèse du cholestérol.

Quant aux modifications des taux plasmatique et hépatique de l'arginine, elles laissent entrevoir une intervention possible de l'adrénaline au niveau de l'uréogénèse. Une expérimentation ultérieure permettrait peut être de confirmer cette hypothèse.

Il n'est cependant pas possible de dégager une interprétation d'ensemble des résultats obtenus, toutefois on peut penser que les grandes voies métaboliques des acides aminés ne sont pas notablement influencées par l'administration d'adrénaline.



## C O N C L U S I O N S

Le travail dont nous avons exposé les modalités techniques avait un double but. Apporter d'une part une contribution aux recherches entreprises dans le laboratoire sur l'action de l'adrénaline au niveau des secteurs liquidiens du tissu musculaire, préciser et compléter d'autre part, les connaissances actuelles sur les effets métaboliques de l'adrénaline chez les Poissons.

De nos expériences, réalisées chez la Truite arc en ciel d'élevage, (*Salmo gairdnerii* Richardson), les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

- 1 - L'adrénaline "in vitro" provoque dans le tissu musculaire squelettique une augmentation de l'espace liquidien extra-cellulaire, qui est due à un transfert d'eau cellulaire.

L'emploi de substances adrénolytiques a permis de montrer l'existence dans ce tissu, de deux types de récepteurs adrénérgiques,  $\alpha$  et  $\beta$  ayant sur le plan des mouvements liquidiens une réactivité identique. La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature montre que l'augmentation de l'espace extra-cellulaire, semble être un effet très général de l'adrénaline.

- 2 - "In vivo" l'étude des effets métaboliques à divers temps suivant l'injection a montré que :

- . L'adrénaline provoque une forte hyperglycémie ; cet effet est inhibé par les substances  $\beta$  lytiques.
- . Le taux d'acides gras libres plasmatiques n'est pas modifié, ce qui confirme l'absence d'effet lipolytique des catécholamines chez les Poissons.
- . L'adrénaline produit une hypercholestérolémie. Cet effet est sous la dépendance de récepteurs de type  $\alpha$ . Il faut noter une différence de réactivité suivant le sexe de l'animal, les mâles présentant une hypercholestérolémie plus forte que les femelles. Il est du plus haut intérêt de reprendre un travail similaire chez les Mammifères pour voir si l'on retrouve une



sensibilité particulière à l'adrénaline des animaux mâles en ce qui concerne l'hypercholestérolémie.

- . Au niveau du métabolisme protidique l'adrénaline provoque des modifications mineures du taux de certains amino-acides, qu'il ne nous a pas été possible d'interpréter globalement.

Cette étude d'ensemble permet de dire qu'il n'y a pas chez les Poissons par rapport aux Mammifères de différences fondamentales dans la réactivité à l'adrénaline, cependant le champs d'action de cette hormone semble plus limité.

VU, le Directeur

Le Président de la Thèse

M. CARRAZ

J. GRAS

VU et permis d'imprimer  
LYON, le 27 septembre 1971

Le Président de l'Université  
CLAUDE BERNARD

J. BOIDIN



B I B L I O G R A P H I E

---

- 1 - AHLQUIST (R.P.)  
A study of the adrenotropic receptors.  
Amer. J. Physiol. 153, 586 - 600, (1948)
- 2 - AHLQUIST (R.P.)  
The adrenergic receptor.  
J. Pharm. Sci. 55, 359 - 367, (1966)
- 3 - ALVING (A.S.), RUBIN (J.), and MILLER (B.F.)  
A direct colorimetric method for the determination of inulin  
in blood and urine.  
J. Biol. Chem. 127, 609, (1939)
- 4 - ANCLA (M.), DEBRUX (J.), CALVARIN (R.) et KAUFMANN (H.)  
Modifications de la paroi aortique du lapin sous l'action de  
l'adrénaline.  
Agressologie, 7, 563, (1966)
- 5 - ARNOLD (A.), and Mc AULIFF (J.P.)  
Correlation of calorigenesis with other beta 1 receptor media-  
ted responses to catecholamines.  
Arch. Int. Pharmacodyn. 179, 381 - 7, (1969)
- 6 - BARR (L.), and MALVIN (R.L.)  
Estimation of extra cellular space of smooth muscle using dif-  
ferent sized molecules.  
Amer. J. Physiol. 208, 1042, (1965)
- 7 - BARRETT (A.M.)  
The role of plasma free fatty acids in the elevation of plasma  
cholesterol and phospholipids produced by adrenaline.  
J. Endocrinol. 36, 301 - 316, (1966)
- 8 - BENTLEY (P.J.) and FOLLET (B.K.)  
The effects of hormones on the carbohydrate metabolism of the  
lamprey (*lampræta fluviatilis*).  
J. Endocrinol. 31, 127 - 137, (1965)
- 9 - BILINSKI (E.), and LAU (Y.C.)  
Lipolytic activity toward long-chain triglycerides in lateral  
line muscle of rainbow trout (*salmo gairdnerii*)  
J. Fish. Res. Bd. Canada. 26, 1857 - 66, (1969)



- 10 - BITMAN (J.), CECIL (H.C.), HAWK (H.W.) and SYKES (J.F.)  
Effect of oestrogenes and progesterone on water and electrolytes content in rabbit uteri.  
Amer. J. Physiol. 197, 93, (1959)
- 11 - BOUGIS (P.)  
Recherches biométriques sur les rougets (Mullus).  
Arch. Zool. Exp. Gen. 84, 57 - 174, (1952)
- 12 - BOURKE (R.S.), BREENBERG (E.S.) and TOWER (D.B.)  
Variation of cerebral cortex fluids spaces in vivo as a function of a species brain sizes.  
Amer. J. Physiol. 208, 682, (1965)
- 13 - BOWLER (R.G.)  
The determination of thiocyanate in blood serum.  
Biochem. J. 38, 385, (1944)
- 14 - BOZLER (E.) and LAVINE (D.)  
Permeability of smooth muscle.  
Amer. J. Physiol. 195, 45, (1958)
- 15 - BÜLBRING (E.), GODDFORD (P.J.) and SETEKLEIV (J.)  
The action of adrenaline on the ionic content and on sodium and potassium movements in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli.  
Brit. J. Pharmacol. 28, 296 - 307, (1966).
- 16 - BUTCHER (R.W.), HO (R.J.), MENG (H.C.) and SUTHERLAND (E.W.)  
Adenosine 3'5' monophosphate in biological materials. The measurement of adenosine 3'5' monophosphate in tissues and the role of the cyclic nucleotide in the lipolytic response of fat to epinephrine.  
J. Biol. Chem. 240, 4515 - 23, (1965)
- 17 - BUTCHER (R.W.)  
Cyclic 3'5' AMP and the lipolytic effects of hormones on adipose tissue.  
Pharmacol. Rev. 18, 237 - 41, (1966)
- 18 - BUTCHER (R.W.)  
Role of cyclic AMP in hormone actions.  
New. Eng. J. Med. 279, 1378 - 84, (1968)
- 19 - CAHN (T.) et HOUGET (J.)  
Etude de la lipémie du lapin et des facteurs qui la conditionnent. Influence de l'adrénaline.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 251, 2613 - 15, (1960)



- 20 - COTLOVE (E.)  
Mechanism and extent of distribution of inulin and sucrose in chloride space of tissues.  
Amer. J. Physiol., 176, 396, (1954).
- 21 - DANIEL (E.E.) and ROBINSON (K.)  
The secretion of sodium and uptake of potassium by isolated uterine segments made sodium rich.  
J. Physiol. 154, 421, (1960)
- 22 - DAVENPORT (H.W.)  
Sodium space and gastric secretion in frog gastric mucosa.  
Amer. J. Physiol. 204, 213, (1963)
- 23 - DEMAEL-SUARD (A.), GARIN (D.) et PERES (G.)  
Effets de l'injection d'adrénaline sur le taux des catécholamines circulantes et sur les réserves glucidiques de la Tanche (*Tinca vulgaris* C.)  
J. Physiol. (Paris), 60, 237 - 39, (1968)
- 24 - DEMAEL-SUARD (A.) et GARIN (D.)  
L'interaction entre l'adrénaline et l'insuline dans la régulation du métabolisme glucidique de la tanche (*Tinca-Tinca* L.)  
C. R. Soc. Biol., 164, 1505 - 1509, (1970)
- 25 - DUNCOMBE (W.G.)  
The colorimetric microdetermination of long chain fatty acids.  
Biochem. J. 88, 7 - 12, (1963)
- 26 - DUNCOMBE (W.G.)  
The colorimetric microdetermination of non esterified fatty acids in plasma.  
Clin. Chim. Acta. 9, 122 - 125, (1964)
- 27 - DURY (A.)  
Effects of epinephrine on lipid partition and metabolism in the rabbit.  
Circulation. Res. 5, 47 - 53, (1957)
- 28 - FÄNGE (R.)  
Pharmacology of poikilothermic vertebrates and invertebrates.  
Pharmacol. Rev. 14, 281 - 316, (1962)
- 29 - FARKAS (T.)  
The effect of catecholamines and adrenocorticotrophic hormone on blood and adipose tissues FFA levels in the fish (*cyprinus carpio* L.).  
Progr. Biochem. Pharmacol. 3, 314 - 319, (1967)



- 30 - FARKAS (T.)  
Examinations on the fat metabolism in fresh water fishes. The sympathetic nervous system and the mobilization of fatty acids. *Annal. Biol. Tihany*, 34, 129 - 138, (1967)
- 31 - FARKAS (T.)  
Effects of some adrenergic blocking agents on the mobilization of fatty acids in lower vertebrates. *Annal. Biol. Tihany*, 35, 127 - 133, (1968)
- 32 - FARKAS (T.)  
Studies on the mobilization of fats in lower vertebrates. *Acta. Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung*, 4, 237 - 249, (1969)  
*In Biol. Astr.* 51, (1970), 66178.
- 33 - FARKAS (T.)  
Effect of agents modifying the level of cyclic 3'5' adenosine monophosphate in adipose tissue on mobilization of fats in fish and frogs. *Annal. Biol. Tihany*, 36, 163 - 171, (1969)
- 34 - FINAGIN (L.K.)  
Effect of carbocholine and adrenaline on cholesterol biosynthesis in rat liver. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 69, 72 - 4, (1970).  
*In Chem. Abstrs.* 72, (1970), 119811s.
- 35 - FRIEDMANN (S.M.), SRETER (F.A.), NAKASHIMA (M.) and FRIEDMANN (C.L.)  
Adrenal cortex and neuro hypophysal deficiency in salt and water homeostasis of rats. *Amer. J. Physiol.* 203, 697, (1962)
- 36 - GANS (J.H.)  
Epinephrine and cholesterol metabolism in the dog. Hepatic metabolism of pyruvate and mevalonate in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 151, 151 - 7, (1966)
- 37 - GAUTHERON (D.) et MORELIS (R.)  
Variations de la vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées et des nucléotides libres dans le muscle sous l'influence de l'adrénaline. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 47, 1923 - 40, (1965)
- 38 - GHOURI (M.S.) and HALEY (T.J.)  
Structure activity relationships in the adrenergic blocking agents. *J. Pharm. Sci.* 58, 511 - 38, (1969)



- 39 - GOODFORD (P.J.) and HERMANSEN (K.)  
Sodium and potassium movements in the unstriated muscle of the guinea pig taenia coli.  
J. Physiol. 158, 426, (1961)
- 40 - GRAS (J.)  
Capacité oxydative du muscle latéral de la truite arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdneri* Rich.).  
C.R. Acad. Sci. (à paraître).
- 41 - HAGEN (J.H.) and HAGEN (P.B.)  
Actions of adrenaline and nor adrenaline on metabolic systems.  
In : Actions of hormones on molecular processes, Ed by Litwack and D., Kritchevsky. p.268 - 319, Wiley, New-York, (1964)
- 42 - HALKERSTON (I.D.K.), EICHHORN (J.), FEINSTEIN (M.), SCULLY (E.) and HECHTER (O.)  
Early permeability effects of oestradiol on castrate rat uterus.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 103, 796, (1960)
- 43 - HENRY (J.C.), PERRIER (H.) et GRAS (J.)  
Influence de l'adrénaline sur la valeur de l'espace extra cellulaire du tissu aortique chez le lapin.  
C. R. Soc. Biol. (Paris), 161, 1611 - 13, (1967)
- 44 - HERMANSEN (K.) and HYTTEL (I.)  
The hyperglycaemic activity of some catecholamines and the effect of  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic blocking compounds in the mouse.  
Acta. Pharmacol. Toxicol. 29, 87 - 94, (1971)
- 45 - HETTIARATCHI (E.S.G.) and PICKFORD (M.)  
Effect of catecholamines and angiotensin on extra cellular water and cation movements and the effect of  $\alpha$  and  $\beta$  adrenoceptor blockade.  
Brit. J. Pharmacol. 41, 302 - 16, (1971)
- 46 - HIGASHI (A.) and PETERS (L.)  
A rapid method for the determination of inulin in plasma and urine.  
J. Lab. Clin. Med. 35, 475, (1960)
- 47 - HIMMS-HAGEN (J.)  
Sympathetic regulation of metabolism.  
Pharmacol. Rev. 19, 367 - 461, (1967)
- 48 - HUBBARD (R.S.) and LOOMIS (T.A.)  
The determination of inulin.  
J. Biol. Chem. 145, 641, (1942)



- 49 - ITAYA (K.) and UI (M.)  
Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids.  
J. Lip. Res. 6, 16 - 20, (1965)
- 50 - KENDALL YOUNG (J.R.) and RAISZ (L.G.)  
An anthrone procedure for determination of inulin in biological fluids.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 80, 771, (1952)
- 51 - KREBS (H.A.)  
Body size and tissue respiration.  
Biochem. Biophys. Acta. (Amst.) 4, 249,-268, (1950)
- 52 - KUNOS (G.) and SZENTIVANYI (M.)  
Evidence favouring the existence of a single adrenergic receptor.  
Nature (London), 217, 1077 - 8, (1968)
- 53 - KUTTNER (R.E.) and LORINCZ (A.B.)  
The effect of catecholamines on free amino acids in rat heart and other organs.  
Arch. Int. Pharm. and Ther. 182, 300 - 309, (1969)
- 54 - LABORIT (H.)  
Etude d'ensemble des mécanismes d'action de l'adrénaline et des agents dits  $\alpha$  et  $\beta$  lytiques sur le système cardio-vasculaire.  
Agressologie, 8, 487 - 512, (1967)
- 55 - LANDS (A.M.), ARNOLD (A.), Mc AULIFF (J.P.), LUDUENA (F.P.), and BROWN (T.G.)  
Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines.  
Nature (London), 214, 597 - 8, (1967)
- 56 - LEIBSON (L.G.), PLISETSKAYA (E.M.) and MAZINA (T.I.)  
Concentration of nonesterified fatty acids in blood plasma of cyclostomata and fishes and its changes under the influence of adrenaline and insulin.  
Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 4, 121 - 7, (1968)
- 57 - LISON (L.)  
Statistique appliquée à la biologie expérimentale.  
Gauthier-Villars Ed. (Paris) 1968, p. 64 - 70.
- 58 - LOVE (R.M.)  
The chemical biology of fishes.  
Academic. Press. 1970



- 59 - Mc FARLAND (W.N.) and KLONTZ (G.W.)  
Anesthesia in fishes.  
Fed. Proc. 28, 1535 - 40, (1969)
- 60 - MATRAY (F.)  
Quelques aspects du métabolisme du muscle lisse et de ses modifications sous l'influence de l'adrénaline.  
Thèse doctorat ès Sciences Paris 1961.
- 61 - MAYER (S.E.), WILLIAMS (B.J.) and SMITH (J.M.)  
Adrenergic mechanisms in cardiac glycogen metabolism.  
Ann. NY. Acad. Sci. 139, 686 - 702, (1967)
- 62 - MAZEAUD (F.)  
Hyperglycémie adrénalinique biphasique chez la carpe.  
C.R. Soc. Biol. (Paris), 158, 1230 - 33, (1964)
- 63 - MONNET (L.), MONNET (M.) et CORNET (A.)  
Dosage du cholestérol du sérum sanguin.  
Ann. Biol. Clin. 26, 915 - 924, (1968)
- 64 - MOORE (S.) and STEIN (W.H.)  
Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids.  
J. Biol. Chem. 176, 367 - 388, (1948)
- 65 - MOORE (S.) and STEIN (W.H.)  
Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins.  
J. Biol. Chem. 192, 663 - 681 (1951)
- 66 - MORELIS (R.), MATRAY (F.) et GAUTHERON (D.)  
Espace extra-cellulaire et vitesses de renouvellement des fractions phosphorylées et des nucléotides libres du muscle utérin.  
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 49, 1707 - 23, (1967)
- 67 - NAKANO (T.) and TOMLINSON (N.)  
Catecholamines and carbohydrates concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) in relation to physical disturbance.  
J. Fish. Res. Bd. Canada, 24, 1701 - 15, (1967)
- 68 - NAYLER (W.G.) and HOWELLS (J.E.)  
Phosphorylase a.b. ratio in the lamprey heart.  
Nature (London), 207, 81, (1965)
- 69 - NORTHROP (G.) and PARKS (R.E.)  
The effects of adrenergic blocking agents and theophylline on 3'5' AMP induced hyperglycemia.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 145, 87 - 91, (1964)



- 70 - NORTHROP (G.)  
Effects of adrenergic blocking agents on epinephrine and 3'5' AMP induced responses in the perfused rat liver.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 159, 22 - 28, (1968)
- 71 - PAPPUS (H.M.) and ELLIOT (K.A.C.)  
Water distribution in incubated slices of bread and others tissues.  
Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 1007, (1956)
- 72 - PEQUIGNOT (J.M.)  
Méthode de dosage et de séparation de l'adrénaline et de la noradrénaline plasmatiques.  
D.E.A. Biochimie, Lyon, 1971.
- 73 - PERCHERON (F.)  
Dosage colorimétrique des cétohexoses par l'acide thiobarbiturique.  
Bull. Soc. Chim. France, 2, 1684, (1963)
- 74 - PERES (G.) et BOCQUET (J.)  
Effet de l'adrénaline sur la teneur en oses neutres du sang d'un selacien : Scylliorhinus canicula.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 161, 2541 - 44, (1967)
- 75 - PERRIER (H.)  
Etude de la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire du tissu aortique chez le lapin. Modifications induites par la L adrénaline et un régime athérogène.  
Thèse doctorat médecine, Lyon, 1967.
- 76 - PLISETSKAYA (E.M.) and MAZINA (T.I.)  
The effect of hormones on the content of non esterified fatty acids in the blood of the baltic lamprey (lampreta fluviatilis).  
Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 5, 457 - 63, (1969)
- 77 - POLONOVSKI (M.)  
Biochimie Médicale.  
Fasicule II Enzymes et Métabolismes. Masson Ed. 9ème édition p.227
- 78 - PORTE (D.)  
Beta adrenergic stimulation of insulin release in man.  
Diabetes, 16, 150 - 155, (1967)
- 79 - PRATESI (P.), GRANA (E.), and VILLA (L.)  
Approach to a chemical interpretation of the activation mechanism of adrenergic receptors.  
Il Farmaco., 26, 379 - 389, (1971)



- 80 - PROSSER (C.L.), BURNSTOCK (G.) and KAHN (J.)  
Conduction in smooth muscle : comparative structural properties.  
Amer. J. Physiol. 199, 545, (1960)
- 81 - RAHWAN (R.G.) and BERGER (J.E.)  
Effect of prenylamine on adrenaline induced hypercholesterolemia in mice.  
J. Pharm. Pharmacol. 22, 962 - 4, (1970)
- 82 - REYNAUD (R.)  
Influence des conditions écologiques et de la sexualité sur la composition biochimique du tissu musculaire de la truite arc-en-ciel d'élevage.  
Thèse Doc. Univ. Pharm. Lyon 1967.
- 83 - ROBISON (G.A.), BUTCHER (R.W.) and SUTHERLAND (E.W.)  
Adenyl cyclase as an adrenergic receptor.  
Ann. NY. Acad. Sci. 139, 703 - 23, (1967)
- 84 - RODIER (J.) et MALLEIN (R.)  
Manuel de biochimie pratique.  
Maloine SA Paris Ed., 3ème edition, p. 185, 1968.
- 85 - ROE (J.H.), EPSTEIN (J.H.) and GOLDSTEIN (N.P.)  
A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine.  
J. Biol. Chem. 178, 839, (1949)
- 86 - ROSS (G.) and MOKOTOFF (R.)  
Determination of inulin in muscle.  
J. Biol. Chem. 190, 659 - 663, (1951)
- 87 - SHAFRIR (E.), SUSSMAN (K.E.) and STEINBERG (D.)  
The nature of the epinephrine induced hyperlipidemia in dogs and its modification by glucose.  
J. Lip. Res. 1, 109 - 117, (1959)
- 88 - SHAFRIR (E.), SUSSMAN (K.E.) and STEINBERG (D.)  
Role of the pituitary and the adrenal in the mobilization of free fatty acids and lipoproteins.  
J. Lipid. Res. 1, 459 - 65, (1960)
- 89 - SHAFRIR (E.) and STEINBERG (D.)  
The essential role of the adrenal cortex in the response of plasma free fatty acids cholesterol and phospholipids to epinephrine injection.  
J. Clin. Invest. 39, 309 - 19, (1960)



- 90 - SCHREINER (G.E.)  
Determination of inulin by means of resorcinol.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 74, 117, (1950)
- 91 - SCHWARTZ (D.)  
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.  
Flammarion Ed. 3ème édition (1963) p. 245 à 257.
- 92 - Second symposium on catecholamines.  
Pharmacol. Rev. 18, 1 - 804, (1966)
- 93 - SOMLYO (A.P.) and SOMLYO (A.V.)  
Vascular smooth muscle.  
Pharmacol. Rev. 20, 197 - 272, (1968)
- 94 - STEINBERG (D.)  
Catecholamines stimulation of fat mobilisation and its metabolic consequences.  
Pharmacol. Rev. 18, 217 - 35, (1966)
- 95 - SUTHERLAND (E.W.) and RALL (T.W.)  
Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.  
J. Biol. Chem. 232, 1077 - 91, (1958)
- 96 - SUTHERLAND (E.W.) and RALL (T.W.)  
The relation of adenosine 3'5' phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and others hormones.  
Pharmacol. Rev. 12, 265 - 99, (1960)
- 97 - SUTHERLAND (E.W.) and ROBISON (G.A.)  
The role of cyclic 3'5' AMP in responses of catecholamines and others hormones.  
Pharmacol. Rev. 18, 145 - 61, (1966)
- 98 - VALETTE (G.), COHEN (Y.) et BRALET (J.)  
Action de l'éphédrine sur l'aorte de rat in vitro : étude à l'aide de la noradrénaline <sup>14</sup>C.  
Biochem. Pharmacol. 15, 177, (1966)
- 99 - VILLAMIL (M.F.), RETTORI (V.), BARAJAS (L.) and KLEEMAN (S.)  
Extra cellular space and the ionic distribution in the isolated arterial wall.  
Amer. J. Physiol. 214, 1104 - 1108, (1968)
- 100 - VOLFIN (P.), CLAUSER (H.) et EBOUE (D.)  
Influence de l'oestradiol et de la progestérone sur la vitesse de renouvellement du phosphate minéral et des nucléotides libres de l'utérus de rat.  
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 44, 205 - 18, (1962)



101 - WEIL (W.B.)

Preparation of a stable form of inulin for tissue analysis.  
Proc. Soc. Exp. Biol. 80, 103 - 104, (1952)

102 - ZENDER (R.) et FALBRIARD (A.)

Analyse colorimétrique des cétohexoses et de l'inuline par la  
réaction à l'acide thiobarbiturique. Conditions de la réaction.  
Clin. Chim. Acta. 13, 246, (1966)



TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                               |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <u>INTRODUCTION</u> .....                                                                                                     | page 1 |
| <br><u>PREMIERE PARTIE</u>                                                                                                    |        |
| Action de l'adrénaline sur les secteurs liquidiens du muscle latéral de la Truite. Action des substances adrénolytiques. .... | 7      |
| I - Généralités sur les méthodes de mesure de l'espace extra-cellulaire des tissus .....                                      | 8      |
| II - Matériel et techniques d'expérimentation .....                                                                           | 16     |
| III - Résultats .....                                                                                                         | 26     |
| IV - Interprétation des résultats .....                                                                                       | 36     |
| <br><u>DEUXIEME PARTIE</u>                                                                                                    |        |
| Etude de certains effets métaboliques de l'adrénaline chez la Truite "in vivo" .....                                          | 42     |
| I - Généralités sur les effets métaboliques des catécholamines..                                                              | 43     |
| II - Matériel et techniques d'expérimentation .....                                                                           | 57     |
| III - Résultats .....                                                                                                         | 65     |
| IV - Interprétation des résultats .....                                                                                       | 83     |
| <br><u>CONCLUSIONS</u> .....                                                                                                  | <br>92 |
| <br><u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....                                                                                                | <br>94 |









